

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**A VITAMINA K EM COMBINAÇÃO COM OUTROS  
MARCADORES BIOQUÍMICOS NO DIAGNÓSTICO DA  
OSTEOPOROSE**

Trabalho submetido por  
**Joana Formiga Marques**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Doutora Luisa Gonçalves**

**Outubro de 2013**



## **Agradecimentos**

Ao longo deste último semestre do curso tive o privilégio e a oportunidade de contactar com excelentes profissionais que me transmitiram todo o seu saber e audácia para enfrentar a próxima etapa que se aproxima. Em primeiro lugar, agradeço à Doutora Luísa Gonçalves pela sua disponibilidade e acessibilidade, e pelos seus conselhos transmitidos para a realização deste trabalho.

Agradeço ainda ao Dr. Ermelindo Fontes e Dr<sup>a</sup> Ana Rita Silva, Farmacêuticos da Farmácia Mirense, local onde estagiei, pois as suas questões sobre este tema suscitaram em mim enorme curiosidade, e de que forma eu posso intervir, enquanto farmacêutica, junto dos utentes.

Por último agradeço à minha família, namorado e amigos, pois, sem a sua ajuda, compreensão e persistência e teimosia não teria cumprido este objetivo.



## **Resumo**

A vitamina K é uma vitamina lipossolúvel que intervém no processo de formação dos fatores de coagulação. Hoje em dia sabe-se que apresenta outras funções com importância fisiológica, relacionadas com o controlo da atividade de remodelação óssea. Assim sendo, a vitamina K está totalmente relacionada com a atividade osteoblástica e osteoclástica decorrente do metabolismo ósseo. Esta dissertação pretende aprofundar o papel da vitamina K no diagnóstico de patologias ósseas, em particular a osteoporose. Estudos recentes consideram que a vitamina K é um promissor marcador do risco de fraturas osteoporóticas e, quando associado a outros marcadores de turnover ósseo, funciona como um marcador de diagnóstico sensível da osteoporose.

É ainda apresentado, ao longo da dissertação, as diferentes isoformas da vitamina K, marcadores de metabolismo ósseo e novos marcadores de diagnóstico, bem como o modo de medição mais efetivo desses mesmos marcadores. Aborda-se ainda o conceito de osteoporose como patologia e a influência da vitamina K no tecido ósseo.

Por último, refere-se a temáticas de fraturas osteoporóticas e o modo como estas podem ser evitadas. Desta forma, é analisado a importância da suplementação de vitamina K para regressão da doença e, por outro lado, a real influência clínica do uso de marcadores de remodelação ósseas no diagnóstico da osteoporose.

Palavras-chave: Vitamina K, marcador de turnover ósseo, metabolismo ósseo, osteoporose.



## **Abstract**

Vitamin K is a fat soluble vitamin that is involved in the formation of coagulation factors. Nowadays it is known that presents other important physiological functions related to the control of the activity of bone remodeling. Thus, the vitamin K is totally related to the osteoblastic and osteoclastic activities resulting from bone metabolism. This paper is intended to further the role of vitamin K in the diagnosis of bone diseases, especially osteoporosis. Recent studies consider that vitamin K is a promising marker of risk of osteoporotic fractures and, when combined with other bone turnover markers, acts as a sensitive diagnostic marker of osteoporosis. It is also shown along the dissertation, the different isoforms of vitamin K and bone metabolism markers novel diagnostic markers, as well as the most effective way of measuring these same markers. It also discusses the concept of pathology such as osteoporosis and the influence of vitamin K bone tissue.

Finally, refers the osteoporotic fractures and how they can be prevented. Thus, it is considered the importance of vitamin K to regression of the disease and, secondly, the actual effect of the use of clinical markers of bone remodeling in osteoporosis diagnosis.

Keywords: Vitamin K, bone turnover marker, bone metabolism, osteoporosis.

## Índice

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Agradecimentos .....                                                                             | 3  |
| Resumo .....                                                                                     | 5  |
| Abstract .....                                                                                   | 7  |
| Índice de Figuras .....                                                                          | 11 |
| Índice de Abreviaturas .....                                                                     | 12 |
| 1. Introdução .....                                                                              | 14 |
| 2. A Vitamina K e sua intervenção clínica .....                                                  | 16 |
| 2.1. História da Vitamina K .....                                                                | 16 |
| 2.2. Mecanismo de ação .....                                                                     | 17 |
| 2.2.1. Outros mecanismos de ação da vitamina K .....                                             | 19 |
| 2.3. Isoformas da vitamina K .....                                                               | 21 |
| 2.4. Vitamina K e seus marcadores funcionais .....                                               | 23 |
| 3. O Tecido Ósseo .....                                                                          | 24 |
| 3.1. O Metabolismo ósseo .....                                                                   | 28 |
| 3.2. Homeostasia do Cálcio .....                                                                 | 30 |
| 3.2.1. Calcitonina .....                                                                         | 32 |
| 3.2.2. Paratormona (PTH) .....                                                                   | 32 |
| 3.2.3. Calcitriol (1,25- (OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> ou 1,25-dihidroxicolecalciferol) ..... | 32 |
| 3.2.4. Vitamina D .....                                                                          | 32 |
| 3.3. Efeitos da vitamina K no metabolismo do osso .....                                          | 33 |
| 4. Marcadores do Metabolismo Ósseo .....                                                         | 34 |
| 4.1. Marcadores de formação óssea .....                                                          | 36 |
| 4.1.1. Fosfatase Alcalina (ALP) .....                                                            | 36 |
| 4.1.2. Osteocalcina (OC) .....                                                                   | 37 |
| 4.1.3. Procolágeno tipo I .....                                                                  | 39 |
| 4.2. Marcadores de Reabsorção Óssea .....                                                        | 40 |
| 4.2.1. Hidroxiprolina (OHP) .....                                                                | 40 |
| 4.2.2. Glicosídeos de Hidroxilisina .....                                                        | 40 |



|          |                                                                                                                                                                        |    |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.3.   | Ligações cruzadas piridínicas: desoxipiridinolina (DPD) e piridinolina (DYP).....                                                                                      | 41 |
| 4.2.4.   | Telopéptido do colagénio tipo I: telopéptido da região carboxiterminal do colagénio tipo I (CTX) e telopéptidos da região aminoterminal do colagénio tipo I (NTX)..... | 42 |
| 4.2.5.   | Sialoproteína óssea (BSP) .....                                                                                                                                        | 42 |
| 4.2.6.   | Marcadores do número de osteoclastos: fosfatase ácida tartrato-resistente (TRAP, TRAcP 5b) .....                                                                       | 43 |
| 4.2.7.   | Catepsina K .....                                                                                                                                                      | 44 |
| 4.2.8.   | Homocisteína.....                                                                                                                                                      | 44 |
| 4.3.     | Breves considerações sobre a recolha de amostras para determinação da concentração de marcadores de remodelação óssea (BTM) .....                                      | 45 |
| 4.3.1.   | Marcadores Séricos vs Urina.....                                                                                                                                       | 46 |
| 5.       | Osteoporose .....                                                                                                                                                      | 47 |
| 5.1.     | Fisiopatologia .....                                                                                                                                                   | 48 |
| 1.1.1.   | Fatores de risco para desenvolvimento da doença .....                                                                                                                  | 48 |
| 1.1.     | Causas secundárias da osteoporose:.....                                                                                                                                | 49 |
| 5.3.     | Subtipos de osteoporose .....                                                                                                                                          | 50 |
| 5.4.     | Métodos de Diagnóstico.....                                                                                                                                            | 51 |
| 5.5.     | Fraturas Osteoporóticas .....                                                                                                                                          | 52 |
| 5.5.1.   | O Papel do RANK / RANKL / OPG e células T na remodelação óssea .....                                                                                                   | 54 |
| 6.       | A Vitamina K no diagnóstico da osteoporose .....                                                                                                                       | 55 |
| 6.1.     | Défice de micronutrientes e o metabolismo da vitamina K .....                                                                                                          | 57 |
| 6.2.     | O contributo da inflamação para o aumento do risco de fratura .....                                                                                                    | 59 |
| 6.3.     | Importância das proteínas da matriz óssea na concentração da vitamina K .....                                                                                          | 59 |
| 6.3.1.1. | Osteocalcina (OC) .....                                                                                                                                                | 60 |
| 6.3.1.2. | PIVAKA-II- Protrombina descarboxilada .....                                                                                                                            | 62 |
| 6.3.1.3. | MGP .....                                                                                                                                                              | 63 |
| 6.4.     | Suplementação de Vitamina K.....                                                                                                                                       | 63 |
| 6.5.     | A influência dos BTM nas patologias ósseas .....                                                                                                                       | 66 |

|        |                                       |    |
|--------|---------------------------------------|----|
| 6.5.1. | Interpretação dos BTM.....            | 66 |
| 6.5.2. | Limitações da utilização dos BTM..... | 69 |
| 7.     | Conclusão.....                        | 71 |

## Índice de Figuras

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Mecanismo de ação da Vitamina K. ....                                             | 18 |
| Figura 2: Vitamina K como cofator da GGCX .....                                             | 19 |
| Figura 3: Estrutura molecular das isoformas da Vitamina K .....                             | 21 |
| Figura 4: Efeitos das modificações da Matriz Óssea.....                                     | 26 |
| Figura 5: Osteogénese .....                                                                 | 27 |
| Figura 6: O Ciclo de remodelação óssea .....                                                | 28 |
| Figura 7: Principais fases do metabolismo ósseo: Formação e Reabsorção.....                 | 31 |
| Figura 8: Marcadores de Metabolismo Ósseo .....                                             | 36 |
| Figura 9: Esquema da osteoclastogénese e os seus principais moduladores.....                | 54 |
| Figura 10: A utilização de Marcadores de turnover ósseo no diagnóstico da Osteoporose ..... | 57 |
| Figura 11: Co-transporte de triglicérideos e Vitamina K .....                               | 58 |
| Figura 12: Relação da ucOC com Vitamina K.....                                              | 62 |
| Figura 13: Comparação entre diferentes marcadores bioquímicos e DEXA .....                  | 68 |

## Índice de Abreviaturas

| <b>Sigla:</b> | <b>Definição:</b>                                        |
|---------------|----------------------------------------------------------|
| ALP           | Fostatase Alcalina                                       |
| BAP           | Fostatase Alcalina óssea                                 |
| BMC           | Conteúdo mineral ósseo                                   |
| BMU (BRU)     | Unidade de remodelação Óssea                             |
| BSP           | Sialoproteína                                            |
| BTM           | Marcadores de turnover ósseo                             |
| CTX           | Telopétido na região carboxiterminal do colagénio tipo I |
| DPD           | desoxipiridinolina                                       |
| GGCX          | Gamaglutamato carboxilase                                |
| GGHL          | Glicosil-galactosil-hidroxilisina                        |
| GHL           | Galactosil-hidrosilina                                   |
| GLA           | Gamacarboxiglutamato                                     |
| GLU           | Ácido glutâmico                                          |
| GRP           | Prteina rica em GLA                                      |
| ICTP          | Telopéptido carboxilo trimérico                          |
| IL-6          | Interleucina-6                                           |
| LSC           | Menor variação significativa                             |
| M-CSF         | Fator estimulante de colónias                            |
| MK-4          | Menaquinona 4                                            |
| MMP           | Metaloproteinases da matriz                              |
| MPG           | Proteína GLA da matriz óssea                             |
| NFκB          | Fator Nuclear κ B                                        |
| NTX           | Telopéptido na região aminoterminal do colagénio tipo I  |
| OC            | Osteocalcina                                             |
| OC            | Osteocalcina                                             |
| OHP           | Hidroxiprolina                                           |
| OI            | Osteogenese imperfecta                                   |
| OPG           | Osteoprotegerina                                         |
| PHPT          | Hiperparatiroidismo Primário                             |
| PIVAKA        | Protrombina Descarboxilada                               |

|                         |                                              |
|-------------------------|----------------------------------------------|
| PTH                     | Paratohormona                                |
| PXR                     | Recetor X "Pregnane"                         |
| PYD                     | Piridinolina                                 |
| RANK                    | Recetor ativador do fator nuclear kappa-B    |
| RANKL                   | Recetor ativado para fator nuclear kappa B   |
| ROS                     | Espécies reativas de Oxigénio                |
| SNP                     | Inglês "Single Polimorfism nucleotid"        |
| SXR                     | Recetor nuclear de esteróides e xenobióticos |
| TM                      | Talassémia Major                             |
| TNF- $\alpha$           | Fator de Necrose Tumoral                     |
| TRAP                    | Fosfatase Ácido Tartarato resistente         |
| ucOC                    | Osteocalcina descarboxilada                  |
| VKD                     | Vitamina K dependente                        |
| $\gamma$ - carboxilação | Gamacarboxilação                             |

## **1. Introdução**

A osteoporose, uma doença caracterizada por uma diminuição da densidade mineral óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, é considerada uma imposição médica emergente do século XXI, devido às suas consequências clínicas, nomeadamente fraturas do fêmur, e elevados custos económicos e humanos associados (Terreni & Pezzati, 2012). A osteoporose é um grave problema de saúde pública e sua incidência tende a aumentar de forma exponencial, dado ao crescente envelhecimento da população (Lee & Vasikaran, 2012; Seibel, 2005).

O interesse por patologias ósseas e a necessidade de implementação de medidas eficazes para efetuar o rastreio, diagnóstico e monitorização tem crescido na prática clínica. Nos últimos anos, o isolamento e caracterização de componentes celulares e extracelulares da matriz óssea promoveram o desenvolvimento de marcadores moleculares associados aos processos de formação óssea e reabsorção óssea (Seibel, 2005). Estes índices bioquímicos têm a vantagem de não serem invasivos, serem relativamente económicos e, quando aplicados e interpretados corretamente, são ferramentas úteis no diagnóstico da doença óssea, bem como na sua posterior monitorização (Seibel, 2005).

De acordo com a OMS, cerca de 30 % das mulheres em fase pós-menopausa sofrem de osteoporose. Nos EUA, cerca de 1,5 milhões de fraturas por ano são atribuídas à osteoporose e os seus custos totais são cerca de 19.000 milhões dólares por ano (Sangkomkamhang, Us, & Ngamjarus, 2010). Em particular, as fraturas do fêmur são uma importante causa de morbilidade e mortalidade em todo o mundo, o risco de morte é maior em pacientes com fraturas osteoporóticas e, em particular, o risco é maior imediatamente após ocorrência da fratura (Sangkomkamhang et al., 2010). A prevalência de osteoporose aumenta com a idade e, nas mulheres, sobe de 2 % aos 50 anos para 25% aos 80 anos. O risco de fratura é maior quando associado a fatores secundários, tais como estilo de vida, terapêutica concomitante, história familiar, entre outras condições (Cianferotti & Brandi, 2012). Nos últimos anos tornou-se cada vez mais evidente que o aporte vitamínico está envolvido em outros processos metabólicos importantes para além das doenças associadas à sua deficiência primária subjacente. A

prolongada deficiência subclínica de vitamina não provoca risco de vida imediato. Com efeito, constitui um fator de risco para o desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade, que serão referidas como doenças de deficiência secundária (Vermeer, 2012).

A vitamina K, para além de intervir na coagulação do sangue, é atualmente conhecida por ser necessária para a prevenção da perda óssea osteoporótica. A maior ameaça aguda de deficiência de vitamina K varia entre hemorragia e a morte (Vermeer, 2012).

Foi proposto uma pesquisa sobre a intervenção dos níveis da vitamina K no diagnóstico da osteoporose. Pretende-se compreender a importância das suas funções a nível fisiológico, isolado ou quando associados a outros biomarcadores. Para a realização deste trabalho foi efetuada uma revisão da literatura científica para compreender a influência da vitamina K no diagnóstico da osteoporose, bem como os elementos associados com o estado de saúde do osso. Para tal, efetuou-se uma pesquisa bibliográfica de literatura científica na MEDLINE, PubMed, ScienceDirect, e B-on e uma pesquisa em numerosos livros sobre a fisiologia do osso. Obteve-se um conjunto de 70 artigos científicos relacionados com o tema. Durante a pesquisa, utilizaram-se diversas palavras-chave, tais como: *Vitamin K*, *Bone Turnover Biomarkers*; *Osteoporosis*, *Diagnosis of osteoporosis*, entre outras. Durante a recolha dos artigos científicos teve-se o cuidado de obter a informação mais recente sobre a intervenção da vitamina K no diagnóstico da osteoporose. Por isso, a compilação de artigos que foi utilizada compreende o período de 2005 a 2013.

## **2. A Vitamina K e sua intervenção clínica**

### **2.1. História da Vitamina K**

A vitamina K é uma vitamina lipossolúvel que foi originalmente identificada como um cofator essencial para a coagulação do sangue. Inicialmente foi descoberto que a vitamina K intervém nos processos de síntese de protrombina e dos fatores de coagulação II, VII, IX e X, razão pela qual, a deficiência de vitamina K resulta numa tendência para originar uma hemorragia sanguínea (Kaneki, Hosoi, Ouchi, & Orimo, 2006). A vitamina K foi descoberta por volta de 1930, através de um estudo utilizando animais (pintos) submetidos a uma dieta isenta de lípidos. Com o decorrer do tempo, estes pintos desenvolveram diátese hemorrágica<sup>1</sup>, uma patologia que tem como etiologia uma anormalidade da parede vascular, e sistemas de coagulação, fibrinólise e déficit de fator XIII (Kaneki et al., 2006). Atualmente, conhece-se as diversas ações fisiológicas da vitamina K onde esta intervém, que se estendem para além da coagulação, razão pela qual a sua deficiência irá afetar diferentes mecanismos fisiológicos, não se restringindo apenas ao comprometimento da cascata de coagulação (Kaneki et al., 2006).

É importante diferenciar os tipos de deficiência de vitamina K existentes: a deficiência “clássica” (clínica), associada ao déficit de fatores de coagulação do sangue que provocam intensas hemorragias, e a deficiência "subclínica", ocorrida em tecidos extra-hepáticos, em particular no osso (Kaneki et al., 2006). A deficiência de vitamina K é uma maior ameaça aguda, que tem como consequência uma grave hemorragia ou até mesmo a morte. A deficiência secundária (ou subclínica) da vitamina K é o maior fator de risco para perda óssea acelerada. A nível fisiológico, a vitamina K entra em circulação sanguínea após ser transportada para o fígado, local onde os fatores de coagulação serão sintetizados. No fígado, uma fração da vitamina K é utilizada para sintetizar fatores de coagulação e, a restante fração é transportada para os tecidos extra-hepáticos, como o osso (Vermeer, 2012).

Estudos clínicos têm demonstrado que a vitamina K ajuda a prevenir futuras fraturas ósseas e, presentemente, é utilizada como tratamento antiosteoporótico em vários países asiáticos, como o Japão. Estudos epidemiológicos referem que baixas

---

<sup>1</sup> Diátese Hemorrágica: Tendência para sangramento sem causa aparente, hemorragias espontâneas ou hemorragia mais intensa ou prolongada após um traumatismo



concentrações de vitamina K no sangue têm sido associadas a outras patologias, tais como: osteoartrite, osteoporose, demência e arteriosclerose (Azuma, Ouchi, & Inoue, 2013). Assim, associado à concentração da vitamina K, surgiu um potencial protetor contra a osteoporose, aterosclerose e hepatocarcinoma (Kaneki et al., 2006).

## **2.2. Mecanismo de ação**

A vitamina K funciona como um cofator para a  $\gamma$ -carboxilação (gamacarboxilação) dos resíduos de ácido glutâmico/glutamato (GLU) em gamacarboxilglutamato (GLA) (Booth, 2009; Holzer et al., 2010; Suzuki et al., 2008). Tal como se verifica na figura 1, a vitamina K atua como um cofator para o enzima GGCX ( $\gamma$ -glutamatocarboxilase) que é encontrado no retículo endoplasmático das células de mamíferos e que catalisa a conversão do aminoácido glutamato em GLA. A oxidação de vitamina K hidroquinona fornece a energia necessária para esta reação de carboxilação. Todas as proteínas-GLA são proteínas secretoras encontradas, quer na matriz extracelular, quer nos fluidos corporais. Os resíduos de GLA promovem fortes ligações entre as proteínas e íons de cálcio. Todas as proteínas-GLA descobertas contêm vários resíduos de GLA que variam desde 3 na Osteocalcina, 10 na protrombina e 16 em proteínas ricas em GLA (GRP) (Vermeer, 2012). Assim, a atividade biológica da vitamina K envolve modificação pós-traducional dos resíduos de ácido glutâmico, na extremidade amino-terminal, por ação de uma carboxilação da vitamina k-dependente (VKD). Esta carboxilação fornece um segundo grupo carboxilo, que permite a quelação do cálcio e funciona como ponte entre os fatores de coagulação e a bicamada fosfolipídica, local onde decorrerá a ativação deste fatores. A reação de  $\gamma$ -carboxilação ocorre no retículo endoplasmático e requer oxigénio, CO<sub>2</sub> e hidroquinona (forma reduzida e ativa da vitamina K). Quando as VKD são carboxiladas pelo GGCX, a vitamina K é oxidada em epóxido, originando assim o epóxido da Vitamina K. Tal como está descrito na figura 2, inicialmente, a hidroquinona é oxidada, originando um epóxido, por ação da vitamina K epoxidase (VKOR) e, simultaneamente ativa o resíduo GLU, formando o GLA. O epóxido da vitamina K é reduzido a quinona por uma redutase sensível à varfarina, que também catalisa a conversão à sua forma ativa (hidroquinona) (Murray et al., 2006).

Os antagonistas da vitamina K, como a varfarina, de nome comercial Varfine® são utilizados para atenuar a coagulação sanguínea dos pacientes com risco de desenvolver trombose. A varfarina, classificada clinicamente como um anticoagulante, é

um inibidor de VKOR, que provoca uma subsequente diminuição da atividade GGCX. VKOR é co-localizado no local de GGCX e da proteína reguladora chamada calumenina, que inibe a atividade da GGCX (figura 1). VKOR é importante para a conversão da vitamina K, que é oxidada durante a carboxilação, dando origem a um epóxido (figura 2). As proteínas contendo ácido glutâmico, tais como fatores de coagulação II (protrombina), VII, IX e X, proteína C e proteína S, são substratos de GGCX e são carboxiladas por este enzima (Plaza & Lamson, 2005). Na presença de um anticoagulante, (figura 2) o epóxido da vitamina K acumula-se e não pode ser reduzido, pois um precursor anormal da protrombina (pré-protrombina), sem resíduos GLA e incapaz de quelar o de cálcio, é libertado para a circulação sanguínea (Murray et al., 2006). Deste modo, na presença de varfarina, VKOR e vitamina K são inibidos, suprimindo assim a atividade de GGCX (Azuma et al., 2013).

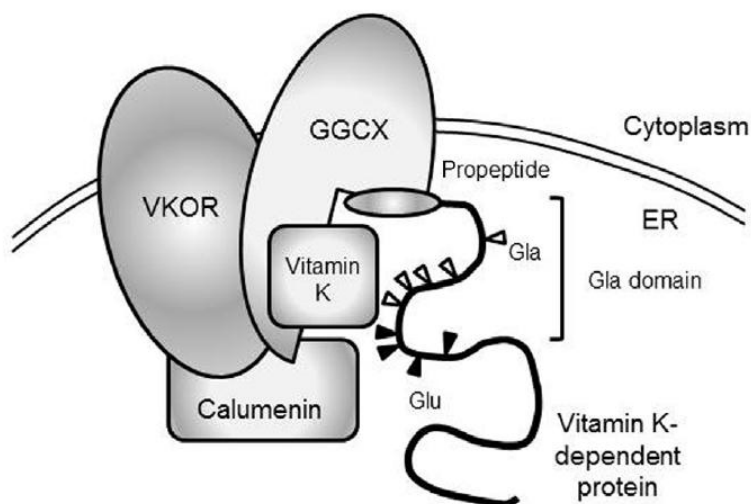


Figura 1: Mecanismo de ação da Vitamina K, (Azuma et al., 2013).

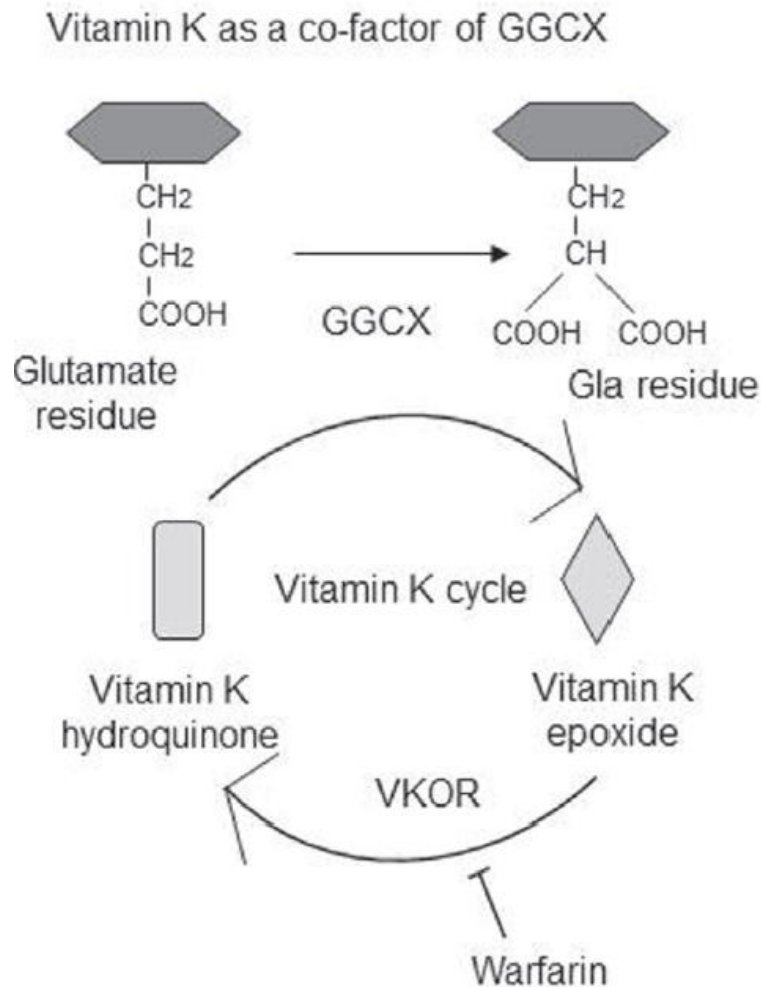


Figura 2: Vitamina K como cofator da GGCX, (Azuma et al., 2013)

### 2.2.1. Outros mecanismos de ação da vitamina K

Dois mecanismos de ação distintos da vitamina K foram descobertos até à data. Um deles é a sua função como cofator de GGCX, e o outro é mediado pelo recetor nuclear, o recetor de xenobióticos e esteróides (SXR), e o seu homólogo, o recetor X “pregnane” (PXR) (Azuma et al., 2013). As funções de vitamina K como um cofator de GGCX são conhecidas desde 1970. GGCX medeia a adição de um grupo carboxilo de resíduos de glutamato no substrato. Os substratos mais conhecidos para esta reação são fatores de coagulação VKD: fator II, VII, IX e X (Azuma et al., 2013).

Recentemente foi descoberto um novo papel para a vitamina K utilizando um ligando do recetor nuclear SXR. Assim, a vitamina K tem um outro mecanismo de ação diferente do anterior, mediado pela regulação da transcrição dos genes alvo SXR / PXR

(Azuma et al., 2013). A vitamina K<sub>2</sub> é um regulador transcricional específico dos genes do tecido ósseo que atua através do recetor SXR para favorecer a expressão de marcadores de formação óssea com atividade osteoblástica (Iwamoto, Takeda, & Sato, 2006). Os genes-alvo típicos incluem a CYP3A4, e o transportador da família ABC, MDR1, indicando que SXR / PXR funciona como um sensor de xenobióticos por genes indutores envolvidos na eliminação e excreção de fármacos. PXR e SXR são membros da superfamília de genes de recetores nucleares que se ligam a elementos do DNA, desempenhando um papel de destaque na eliminação de produtos químicos.

A expressão de SXR / PXR é também verificada no rim e pulmão. Foi recentemente demonstrado que MK4 atua como um ligando para SXR em osteoblastos humanos. SXR é expresso por células osteoblásticas e é ativado pela vitamina K<sub>2</sub>. MK4 induz a gênese osteoblástica e é mediada por PXR, pois liga-se a este recetor (Igarashi et al., 2007a). Como a vitamina K é um meio de ligação promissor para SXR / PXR colocou-se a possibilidade da vitamina K estar envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos, através da regulação de genes alvo PXR / SXR (Azuma et al., 2013). Em estudos realizados em tecido ósseo com défice de PXR demonstram que a vitamina K promove um efeito osteoprotetor, mediado pelo SXR/PXR (Azuma et al., 2013).

Os efeitos da vitamina K sobre o tecido ósseo são mediados pela  $\gamma$ -carboxilação e são difíceis de avaliar, pois as ações hepáticas dificultam a análise das funções extra-hepáticas de GGCX. Estudos demonstram polimorfismos de nucleótidos (SNP: “single polimorfismo nucleotid”) de genes funcionais em que associa GGCX com a densidade mineral óssea (Azuma et al., 2013). Considerando que é um nutriente, a vitamina K é um agente terapêutico promissor para a medicina geriátrica pois é relativamente segura na utilização clínica, (Azuma et al., 2013).

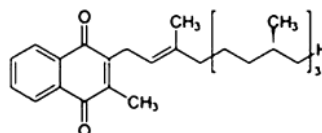
Tem sido demonstrado que as vitaminas K<sub>1</sub> e K<sub>2</sub> exercem os efeitos protetores contra a osteoporose (Kaneki et al., 2006). A vitamina K apresenta ainda propriedades antioxidantes. A MK-4 é um antioxidante 15 vezes mais potente que a filoquinona. Tem sido evidenciado que a menaquinona protege as células neuronais da apoptose, diminuindo assim o stress oxidativo. Filoquinona e MK-4 inibem a morte celular induzida pelo stress oxidativo em oligodendrócitos (Kaneki et al., 2006). Duas formas de vitamina K, filoquinona e MK-4, encontram-se no pâncreas e no fígado, e ambas podem atuar como cofator para a  $\gamma$ - carboxilação. (Booth, 2009).

Clinicamente, a vitamina K2 mantém a DMO e impede fraturas osteoporóticas em pacientes com osteoporose pós-menopausa, evitando assim a perda da DMO lombar por aumentar a concentração da osteoprotegerina (OPG) e reduz a incidência de fraturas vertebrais (Iwamoto et al., 2006). A atividade da vitamina K2 insere-se num aumento no processo de formação de osso e diminuição de perda óssea. A vitamina K2 exerce uma influência mais forte e poderosa no osso do que a vitamina K1 (Azuma et al., 2013). Por outro lado, a formação osteoblástica é induzida por MK4 que exerce uma ação osteoprotetora por regulação da expressão do gene *Msx2* (Igarashi et al., 2007b). O gene *Msx2* encontra-se envolvido no metabolismo ósseo, pois induz a diferenciação do osteoblasto. (Azuma et al., 2013).

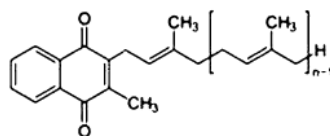
### 2.3. Isoformas da vitamina K

A vitamina K engloba uma família de isoformas estruturalmente semelhantes, lipossolúveis (figura 3) tendo como base o mesmo anel naftoquinona, mas que difere nas suas cadeias laterais, apesar da vitamina K3 não tem uma cadeia lateral. Inclui nesta família filoquinona (K1), menaquinonas (K2), e menadiona (K3) (Azuma et al., 2013).

Vitamin K1 (Phylloquinone)



Vitamin K2 (Menaquinone)



Vitamin K3 (Menadione)

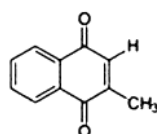


Figura 3: Estrutura molecular das isoformas da Vitamina K, (Azuma et al., 2013)

➤ **A Filoquinona** (vitamina K1) é a principal isoforma da vitamina K. Pode ser encontrada em legumes verdes, como couve, espinafre, bróculos, couve-de-bruxelas e ainda em óleos vegetais (Booth, 2009; Kaneki et al., 2006). A baixa ingestão de filoquinona foi associada a um aumento do risco de fratura do fêmur em idosos (Sogabe, Maruyama, Baba, Hosoi, & Goseki-Sone, 2011). Por outro lado, níveis séricos de filoquinona não estão linearmente relacionadas com os níveis de osteocalcina descarboxilada (McCormick, 2007).

➤ **A Menaquinona** (vitamina K2) é sintetizada por bactérias da flora intestinal, mas também está presente em alimentos, como carne, ovos, requeijão, queijo e natto<sup>2</sup> (Kaneki et al., 2006). Existem diferentes isoformas: MK-4, MK-7, MK-8, MK-9 e MK-10. A forma mais comum de vitamina K2 é MK-4, a única das menaquinonas que é alquilada a partir de menadiona (vitamina K3) presente alimentos e também é o produto de conversão direta de filoquinona proveniente da dieta. MK- 4 e 9 são encontradas em baixas quantidades nos alimentos de origem animal, tais como carne de frango e queijo, enquanto que MK-7 é encontrado em grandes quantidades em leguminosas, e principalmente em natto (Booth, 2009).

Estudos decorridos no Japão sugerem que o consumo de natto está também associado com uma maior DMO e menor incidência de fratura do fêmur (Yamauchi, Yamaguchi, Nawata, Takaoka, & Sugimoto, 2010). O resultado da saúde óssea é reflexo das dietas geralmente mais saudáveis, o que também estão associados positivamente com a saúde óssea em estudos de base populacional (Booth, 2009). Estudos realizados verificaram que a MK-4, durante o turnover ósseo, diminui a atividade dos osteoclastos (reabsorção) e promove um aumento da formação óssea através dos osteoblastos (Kaneki et al., 2006). Entre os homólogos da vitamina K, a MK-4 é a biologicamente mais ativa, sendo regulada pela expressão dos genes dos marcadores do osso. Recentemente, confirmou-se que a filoquinona proveniente da dieta decompõe-se em MK-4 através do seguinte mecanismo: depois de uma fração de quinona da PK dietética ser reduzida a hidroquinona com uma redutase como o NADPH desidrogenase, quinona (NQO), NQO2, ou glutathiona-redutase, a fração da cadeia lateral é clivada por um enzima específico. O intermediário resultante, A vitamina K3 (menadiona) é posteriormente convertida para MK-4 hidroquinona por uma reação de formação

---

<sup>2</sup> Natto: uma soja fermentada tradicional no leste do Japão, típica da alimentação oriental.

derivada da via do mevalonato. Finalmente, a MK-4 hidroquinona é convertida para MK-4 e acumula-se em diversos tecidos em elevadas concentrações. Em certos tecidos, tais como tecido do cérebro, que contém elevadas concentrações de componentes lipídicos, a MK-4 é a forma de vitamina K que está mais presente (Suhara, Wada, & Okano, 2009). No que se refere aos efeitos sobre o turnover osso, a MK-4 tem demonstrado diminuir reabsorção óssea dos osteoclastos e promover a formação óssea (Kaneki et al., 2006).

A MK-4 desempenha um papel importante em diversas funções biológicas como a formação óssea (Suhara et al., 2009). Recentemente, foi descoberto um novo papel para a vitamina K. Foi revelado que a MK-4 tem ações biológicas adicionais relacionadas com a transcrição do gene através do SXR, associado à supressão da proliferação da célula cancerosa. Além disso, foi demonstrado que MK-4, bem como PK protege os oligodendrócitos imaturos dos neurónios corticais de lesões oxidativas, independente da reação  $\gamma$ -carboxilação de VKD (Suhara et al., 2009). Recentemente, a vitamina K2 é ainda administrada a recém-nascidos para prevenir hemorragia intracraniana (Azuma et al., 2013).

➤ **Menadiona** (vitamina K3) são compostos sintéticos, não encontrados na natureza, que funciona como um pro-vitamina pois, quando administrados *in vivo* são decompostos, por ação de bactérias intestinas e enzimas digestivas, em filoquinona. A menadiona pode funcionar como um cofator de enzimas na prevenção de deficiência de vitamina K. (Booth, 2009). No entanto, a vitamina K3 não pode exercer todas as funções naturais da vitamina K, pois tem uma transformação limitada em formas de vitamina K lipossolúveis (Plaza & Lamson, 2005).

#### **2.4. Vitamina K e seus marcadores funcionais**

Os marcadores funcionais fornecem uma avaliação mais precisa da concentração de vitamina K, que inclui o tempo de protrombina, protrombina descarboxilada (PIVKA-II), e ucOC (Yamauchi et al., 2010). Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado a associação entre marcadores biológicos do metabolismo ósseo e ingestão de vitamina K. Ao comparar o efeito da filoquinona ou MK-4 no BMD, a força dos ossos, acumulação de gordura, e os parâmetros do soro *in vivo*, o conteúdo mineral ósseo (BMC) total e BMD do fêmur foram aumentados significativamente com filoquinona.

Estudos efetuados revelam os diferentes efeitos da filoquinona e MK-4 em parâmetros ósseos e sugeriram que a filoquinona tem efeitos benéficos no aumento tanto da BMC e BMD femoral, enquanto que o MK-4 tem efeitos benéficos do aumento da BMC femoral, turnover ósseo, largura e parâmetros de resistência do osso. Foi ainda relatado que o MK-4 inibe a reabsorção óssea, mas a filoquinona não tem tal efeito. MK-4 inibiu significativamente a libertação de cálcio e o efeito inibitório de MK-4 sobre a libertação de cálcio não estava afetada pela adição de varfarina, um inibidor do ciclo da vitamina K (Yamauchi et al., 2010). Existe uma maior probabilidade de desenvolvimento de osteoporose e fraturas resultantes da utilização a longo prazo de varfarina, que inibe o efeito de reabsorção e remodelação óssea (Plaza & Lamson, 2005; Yamauchi et al., 2010). Deve notar-se que o efeito anticoagulante da varfarina, funcionando por sua interferência com o efeito de coagulação de vitamina K, pode ser compensado com administração de 1 mg de vitamina K. Portanto, a utilização de vitamina K está contra-indicada em indivíduos com terapia anticoagulante (varfarina) (Kaneki et al., 2006; Plaza & Lamson, 2005). Foi relatado que o uso de varfarina durante a gravidez provoca de anomalias fetais, razão pela qual a sua administração está contra-indicada (Azuma et al., 2013). Em geral, a administração segura da vitamina K, até 45 mg/d de MK-4, tem sido bem estabelecida na população adulta, exceto em mulheres grávidas. (Kaneki et al., 2006). Posto isto, o efeito inibitório de MK-4 sobre a reabsorção óssea não ocorre por influência da  $\gamma$  – carboxilação (Sogabe et al., 2011).

### **3. O Tecido Ósseo**

O sistema esquelético confere suporte e proteção a todo o corpo. Assegura todos os movimentos de flexão e de contração muscular, bem como o armazenamento de minerais, como o cálcio e fósforo, outros iões, e gordura. É ainda produtor de células sanguíneas, pois, no seu interior, aloja-se a medula óssea (Seeley et al, 2005).

Associado à função de desenvolvimento do tecido ósseo está a cartilagem hialina. Esta cartilagem apresenta uma matriz de suporte constituída por colagénio, proteoglicanos e água. O colagénio é o principal responsável pela força e resistência da cartilagem, assegurando a sua adesão. Os agregados de proteoglicanos armazenam a água, assegurando a porção hídrica da cartilagem. A água é responsável pela natureza



resiliente da cartilagem. De notar que o conteúdo hídrico na cartilagem hialina é o mais elevado que em qualquer outro tecido conjuntivo. O tecido conjuntivo pode ser classificado como “propriamente dito”, onde engloba o tecido adiposo, tecido elástico, hematopoiético e tecido mucoso e, por último, inclui ainda o tecido cartilágneo e ósseo (Seeley et al, 2005). As células produtoras da matriz da cartilagem hialina designam-se condroblastos- “*Chondros*” significa cartilagem. Os condroblastos são células imaturas que, quando envolvidas pela matriz da cartilagem, diferenciam-se em condrócitos (Seeley et al, 2005).

Cada osso pode ser classificado de acordo com a sua forma e dimensão, como longo, curto, achatado ou irregular. Na sua constituição, a superfície externa do osso denomina-se perióstio, que é composto por duas camadas: fibrosa externa e interna (ver anexo 1) (Seeley et al, 2005). A primeira é constituída por tecido conjuntivo denso, fibroso e irregular e por colagénio, que retém vasos sanguíneos e nervos e confere flexibilidade à matriz óssea. Existem dois tipos principais de células ósseas, ou seja, os osteoclastos e os osteoblastos. A camada interna consiste numa única camada de osteoblastos e alguns osteoclastos, as principais células do tecido ósseo (Seeley et al, 2005). Os osteoblastos são células produtoras de tecido ósseo, formando a parte orgânica da matriz, contrariamente aos osteoclastos, que são células responsáveis pela degradação, reabsorção e remodelação óssea. As suas origens são diferentes: enquanto que o osteoblasto deriva de células não especializadas, localizadas no perióstio e endóstio, o osteoclasto deriva de células não especializadas, localizadas na medula óssea osteogénicas (Seeley et al, 2005). Porém, o perióstio reveste a superfície externa do osso e contém fibroblastos e colagénio, e o endóstio reveste a superfície interna do osso. A partir do momento em que o osteoblasto fica rodeado por matriz óssea designa-se osteócito (figura 5). Em conjunto, estas células geram um ciclo de remodelação óssea (figura 6). Os osteoclastos desempenham um papel importante na remodelação óssea e homeostasia. As suas secreções incluem ácido cítrico e ácido láctico, que facilitam na dissolução dos minerais e digestão do colagénio através da ação da collagenase (Seeley et al, 2005).

O osso é um tecido dinâmico que está em constante remodelação ao longo da sua vida. É composto principalmente por sais minerais inorgânicos (cálcio e fosfato) e uma matriz orgânica (colagénio do tipo I). O osso é um tecido dinâmico que passa por remodelações constantes durante a vida; além disso, forma um reservatório de cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P) e outros iões essenciais às funções homeostáticas. A

abordagem nutricional para alcançar uma BMD ideal requer alimentação equilibrada. Os elementos relacionados com o metabolismo ósseo são cálcio, fósforo, proteínas, potássio, vitaminas A e K, flúor, zinco, cobre e boro (De, 2007). A participação das células ósseas no crescimento, modelando e remodelação do osso, embora elas representem apenas uma pequena fração de volume. A matriz orgânica óssea é constituída principalmente por colagénio (90 %), bem como outras proteínas de matriz e proteoglicanos (Seeley et al, 2005).

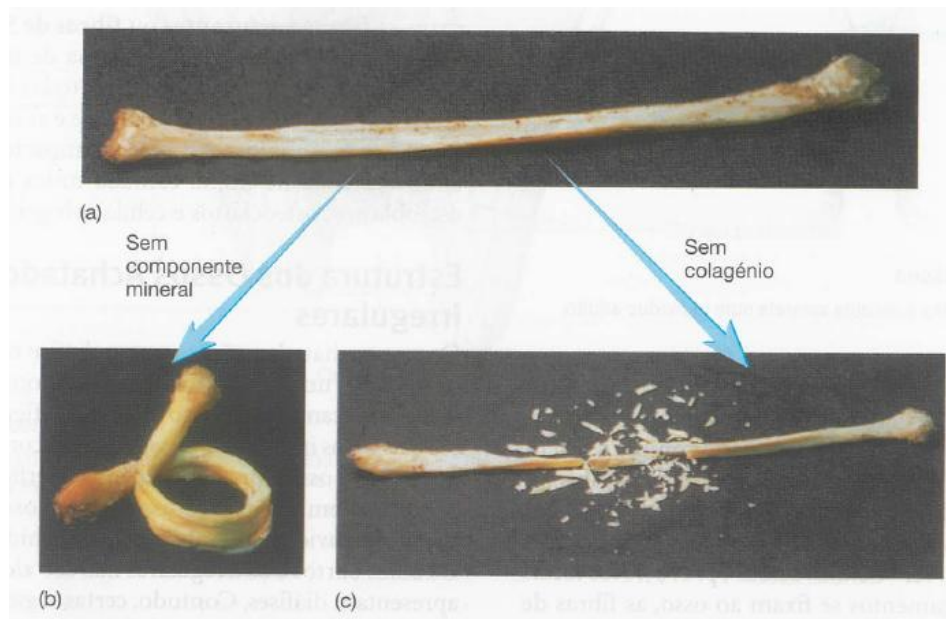


Figura 4: Efeitos das modificações da Matriz Óssea, (Seeley et al, 2005)

O tecido ósseo é ainda constituído por fibras perfurantes ou fibras de Sharpey, que penetram o perióstio até à parte exterior do osso e ajuda na fixação dos tendões, ligamentos e perióstio ao osso (ver anexo 1) (Seeley et al, 2005). A estrutura óssea apresenta uma zona compacta, designada de zona cortical, sem espaços medulares, e por uma zona esponjosa (zona trabecular) com amplos espaços medulares. A envolver a superfície interna do osso está o endóstio, constituído por uma única camada de osteoblasto e osteoclastos. Por outro lado, o osteóide é a matriz óssea recém-formada, adjacente aos osteoblastos que ainda não está calcificada. Após formado o tecido ósseo contém uma matriz óssea, constituída por 35% de matéria orgânica e 65% de matéria inorgânica. O principal componente orgânico é o colagénio tipo I e os componentes inorgânicos são os minerais de cálcio e fósforo que, sob a forma de fosfato de cálcio, constitui a hidroxiapatite. Os minerais conferem à matriz força de compressão. Tanto o

colagénio com os minerais são dois componentes essenciais e indissociáveis para o tecido ósseo. Sem colagénio, o osso torna-se mais frágil e mais suscetível a quebras. Porém, sem a sua porção mineral, o osso torna-se exageradamente flexível (figura 4) (Seeley et al, 2005).

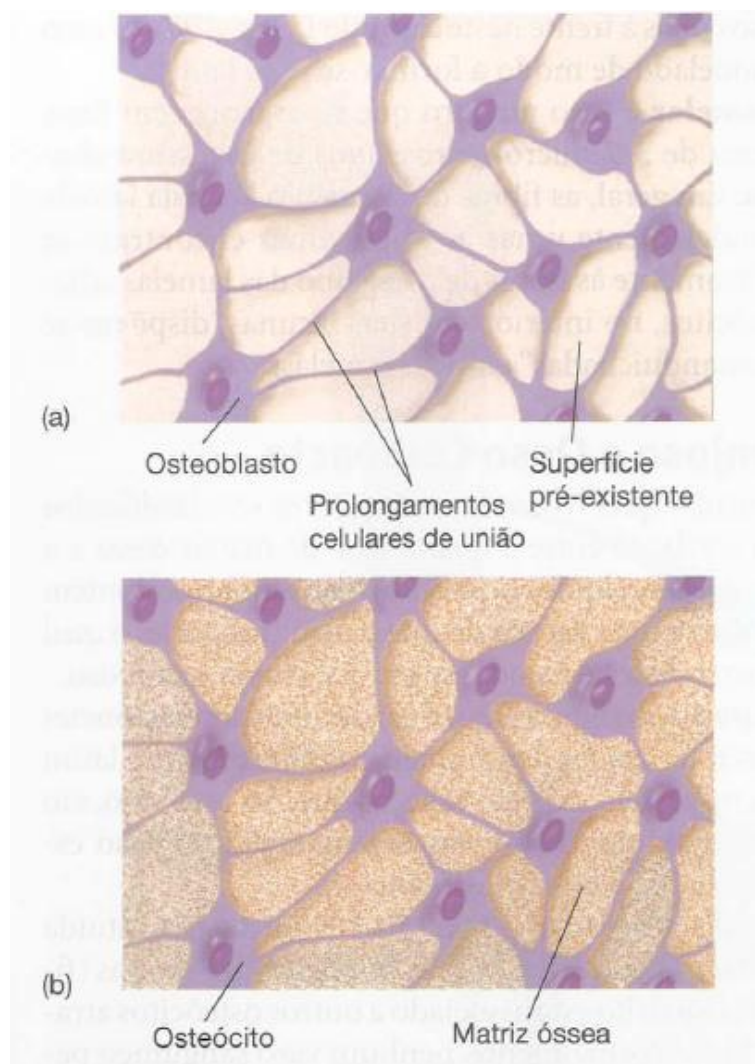


Figura 5: Osteogénese, (Seeley et al, 2005)

O rácio de formação ou degradação da matriz óssea pode ser avaliado por medição da atividade enzimática relacionada com a formação óssea ou reabsorção celular, que constitui o ciclo de remodelação óssea (figura 6) (Seeley et al, 2005). Os componentes da matriz óssea são libertadas para a circulação, quer pelos osteoblastos quer pelos osteoclastos. A formação óssea é um processo ordenado, no qual o mineral inorgânico é primeiro depositado em relação à matriz orgânica (Sachdeva, Seth, Khosla, & Sachdeva, 2005). Durante a reabsorção óssea, o cálcio e fósforo são libertados

primeiro para o fluido extracelular, e a matriz orgânica é posteriormente reabsorvido. As concentrações de cálcio, magnésio e fosfato no plasma são dependentes do efeito da deposição mineral óssea e reabsorção, a sua absorção intestinal e da excreção renal. A PTH e calcitriol são as principais hormonas que regulam estes processos (Sachdeva et al., 2005).

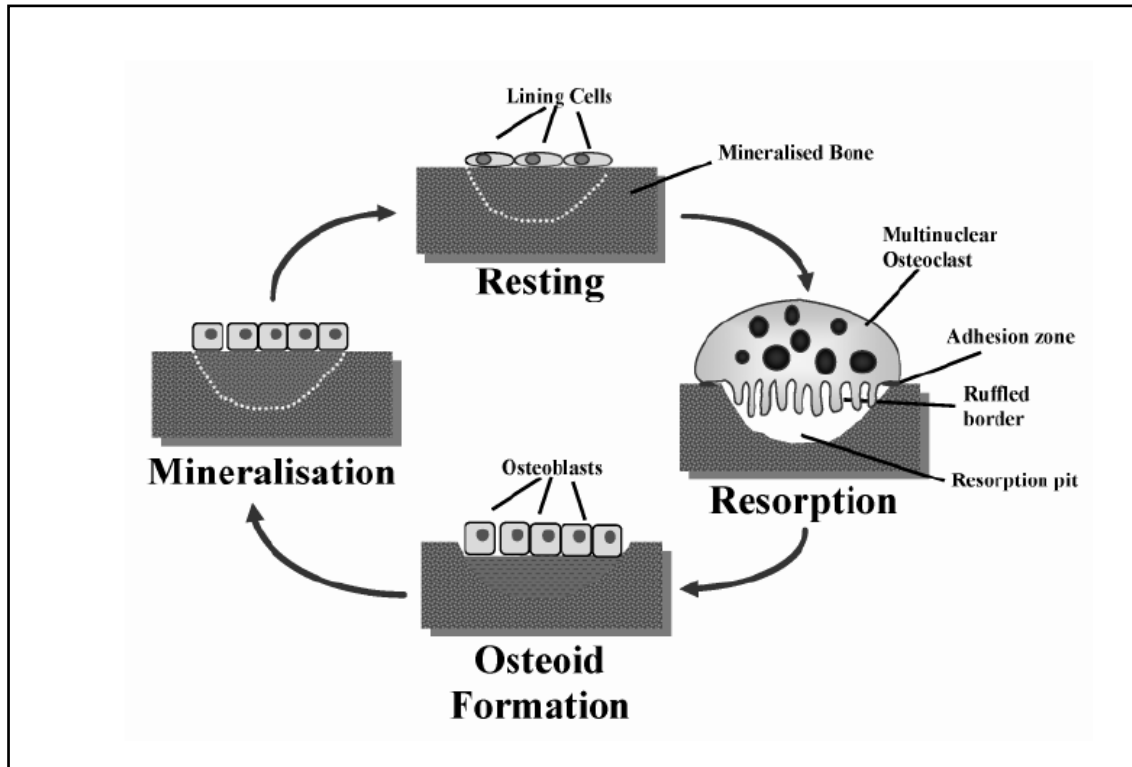


Figura 6: O Ciclo de remodelação óssea, (Seibel, 2005)

### 3.1. O Metabolismo ósseo

O osso é um tecido metabolicamente ativo que sofre contínua remodelação por dois processos que agem em simultâneo, ou seja, formação e reabsorção óssea (figura 6). De seguida, os osteoblastos formam uma matriz óssea extracelular constituída por hidroxiapatite e colagénio (Seeley et al, 2005). Estes processos dependem da atividade de osteoclastos (reabsorção), osteoblastos (formação) e osteócitos (manutenção). A formação óssea dura cerca de 3 a 5 meses e é independente da reabsorção óssea. Os principais estímulos para a formação óssea são as forças mecânicas. Uma vez formado, o tecido ósseo é continuamente renovado e modificado pelo sistema remodelação, e a taxa de remodelação é entre 2% e 10% da massa esquelética por ano. A massa óssea depende do balanço entre a reabsorção e a formação dentro de uma unidade de remodelação (Suzuki et al., 2008). Para ocorrer o crescimento ósseo, é necessário

ocorrer a mineralização e posterior ossificação. A mineralização é um processo complexo que consiste na deposição de iões, como o fosfato e cálcio, na matriz óssea. Após a ossificação, ocorre a remodelação da matriz óssea ou seja, remodelação do antigo tecido ósseo pelos osteoclastos e deposição de novo pelos osteoblastos. É ainda responsável pela formação de novo sistema de Havers (ver anexo 1) (Seeley et al, 2005).

A saúde do osso é garantida por um processo equilibrado de remodelação que assegura a substituição contínua do osso antigo, enfraquecida pelas microfraturas, por osso novo recém-formado. Este é um processo acoplado envolvendo a reabsorção óssea pelos osteoclastos e nova formação de osso pelos osteoblastos. O fracasso em alcançar pico de massa óssea ou o desacoplamento da remodelação pode resultar em fragilidade óssea (McCormick, 2007).

O metabolismo ósseo é caracterizado por duas atividades opostas inter-relacionadas: reabsorção e formação óssea. Eles são acoplados no tempo e no espaço o nível de uma unidade de base multicelular, BMU (também designado de BRU: unidade remodelação óssea) (Szulc, 2012). Durante a remodelação óssea, a formação óssea é precedida pela reabsorção do osso. A reabsorção óssea consiste na dissolução do mineral do osso, o catabolismo dos constituintes da matriz do osso por osteoclastos e libertação de componentes da matriz óssea (que pode sofrer mais do catabolismo principalmente no fígado e nos rins) (Szulc, 2012). Durante a formação do osso, osteoblastos sintetizam matriz óssea e o osso sofre rápida mineralização primária, seguidos de mineralização secundária mais lenta, realizada a longo prazo (Szulc, 2012). Uma vez formados, os ossos são continuamente renovados e modificados com uma taxa de remodelação entre 2% e 10% do esqueleto massa por ano. A remodelação da massa óssea depende do equilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea (Szulc, 2012).

Com a idade, ocorre um desacoplamento na renovação óssea e desequilíbrios de turnover ósseo devido a mudanças na estrutura óssea, força e massa óssea. Enquanto a estrutura e força óssea são difíceis para medir *in vivo*, a massa óssea pode ser avaliada por técnicas de densitometria óssea-DEXA. Assim, a medição de marcadores do metabolismo do osso torna-se extremamente útil para a detecção da dinâmica do desequilíbrio metabólico (Seibel, 2005).

O metabolismo ósseo é avaliado através de marcadores de turnover ósseo (BTM). Os BTM refletem o efeito metabólico dos fármacos na remodelação óssea, ajuda a estabelecer a menor dose induzindo a maior mudança na BTM, prever redução

relacionada com o tratamento em risco de fratura, e são úteis para colmatar estudos. As alterações nos BTM durante o tratamento para a osteoporose dependem do mecanismo de ação do fármaco, do grau de alteração da taxa de formação óssea e da via sua via de administração (Szulc, 2012). BTM ajudam a determinar a dose ótima de fármaco a utilizar, pois as alterações relacionadas com o tratamento em BTM são mais rápidas em comparação com alterações na DMO (Szulc, 2012).

A remodelação óssea altera o tamanho e arquitetura interna do osso pela deposição ou remoção de componentes do osso a partir da superfície dos ossos. A resistência óssea depende muito da atividade de turnover ósseo. Uma vez que todo este processo de calcificação no osso demora cerca de 3 meses, elevadas velocidades turnover ósseo interferem com o processo de mineralização completo e reabsorção óssea, o que pode reduzir BMD. A remodelação óssea influencia fortemente propriedades fisiológicas do osso, incluindo a natureza e quantidade de colagénio, bem como outras proteínas específicas da matriz do osso tais como osteocalcina (Piatek et al., 2013).

### **3.2. Homeostasia do Cálcio**

O osso regula os níveis sanguíneos de cálcio, cujos limites devem ser mantidos constantes para garantir funções essenciais ao organismo como contração muscular e despolarização da membrana. O tecido ósseo é o principal local de armazenamento de cálcio, embora não seja o único. Os movimentos de entrada e saída de cálcio da matriz óssea ajudam a determinar os níveis sanguíneos de cálcio. Sob condições normais, os mecanismos de formação e reabsorção óssea estão firmemente acoplados, de modo que a quantidade de osso removido é sempre igual a quantidade de osso novo formado (figura 7) (Seeley et al, 2005). Quando os níveis de cálcio no sangue são muito baixos, a atividade osteoclástica (reabsorção óssea) aumenta: é libertado mais cálcio pela ação dos osteoclastos do tecido ósseo para o sangue, onde é removido pelos osteoblastos para construir novo tecido ósseo. Consequentemente, existe um maior movimento do cálcio para a corrente sanguínea. Por outro lado, quando os níveis de cálcio no sangue são muito elevados, ocorre o inverso: a atividade osteoclástica diminui, é libertado menos cálcio pelos osteoclastos para produção de osso novo, e o cálcio movimenta-se do sangue para o tecido ósseo, aumentando assim a formação óssea (Seeley et al, 2005).

Assim, perturbações na homeostase óssea conduzem a um aumento da fragilidade óssea (McCormick, 2007).

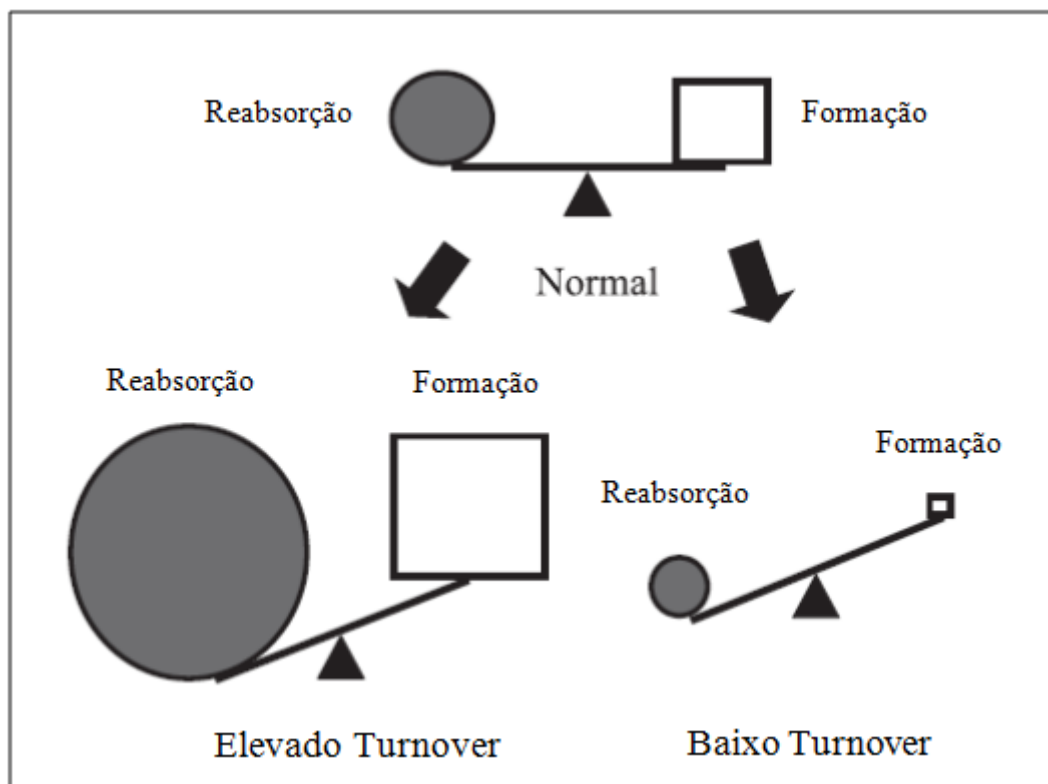


Figura 7: Principais fases do metabolismo ósseo: Formação e Reabsorção. (adaptado de Suzuki et al., 2008)

No entanto, desequilíbrios entre a reabsorção óssea e de formação óssea resultam em perda ou ganho acentuado de massa óssea. O turnover ósseo requer ações sequenciais e coordenada dos osteoclastos, para remover osso (reabsorção do osso) e os osteoblastos para substituí-lo (formação óssea) (Suzuki et al., 2008). Fatores externos podem interferir no metabolismo ósseo. Quando existe um elevado turnover ósseo, a reabsorção osteoclástica é acelerada, e é inadequadamente substituído por formação de novo osso pelos osteoblastos. Pelo contrário, sob a baixo turnover ósseo a taxa de remodelação óssea é extremamente baixa, que se deteriora a propriedade mecânica do osso. Em condições patológicas, a reabsorção do osso é maior do que a formação óssea independentemente da taxa de rotatividade do osso (figura 7) (Suzuki et al., 2008).

A homeostase óssea é assegurada pelos seguintes intervenientes:

### 3.2.1. Calcitonina

É uma hormona hipercalcémica produzida pela tiroide, que inibe a reabsorção de cálcio pela matriz óssea (Seeley et al, 2005). É um péptido que age através de recetores específicos para inibir diretamente a função dos osteoclastos. Encontra-se no pulmão, cérebro e próstata. Existem estudos que demonstram que a calcitonina diminui a dor óssea em fraturas vertebrais osteoporóticas. No Japão, uma vez por semana, é recomendada a administração intramuscular de calcitonina, não para impedir a fratura osteoporótica, mas para o alívio da dor óssea após fratura vertebral (Suzuki et al., 2008).

### 3.2.2. Paratormona (PTH)

Estimula a formação óssea e aumentar a reabsorção do osso. Atua no osso, ligando-se aos osteoblastos para estimular a osteoclastogenese e aumentar as concentrações de cálcio e fosfato. Atua ainda no rim e no intestino. No rim, esta hormona atua na Ansa de Henle e promove a reabsorção de cálcio e excreção de fosfato. Por outro lado, no intestino a sua ação é similar à do rim, mas favorece ainda a formação de calcitriol. A administração de PTH é revelada para estimular a formação óssea *in vitro* e *in vivo*. Na prática clínica, o hiperparatiroidismo é uma das causas de osteoporose secundária. (Suzuki et al., 2008).

### 3.2.3. Calcitriol (1,25- (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ou 1,25-dihidroxicolecalciferol)

Forma-se a partir da vitamina D, sendo a sua forma ativa. O calcitriol favorece a reabsorção óssea e absorção óssea e intestinal de cálcio e de PTH (Suzuki et al., 2008). É ainda um indicador para o estado funcional da vitamina D (McCormick, 2007). Para manter a função da célula normal do osso, o nível de calcitriol sérico deve ser mantido entre 30 e 80 ng/mL (McCormick, 2007).

### 3.2.4. Vitamina D

A vitamina D é um nutriente essencial para a absorção de cálcio a partir do intestino (Plaza & Lamson, 2005). A evidência científica apoia a utilização de cálcio em combinação com vitamina D, no tratamento preventivo da osteoporose (Suzuki et al., 2008). Para além do papel no metabolismo dos minerais e manutenção dos níveis de cálcio intracelular, a vitamina D é importante para a diferenciação e proliferação celular, o crescimento do músculo, e aquisição de força. A deficiência da vitamina D pode deteriorar a resistência óssea e aumentar a fragilidade do osso. Por outro lado, a



deficiência também tem sido associada a um risco aumentado de desenvolvimento de cancro, Diabetes Mellitus do tipo I, e doença cardíaca (McCormick, 2007).

### 3.3. Efeitos da vitamina K no metabolismo do osso

A vitamina K<sub>2</sub> exerce uma poderosa influência na formação óssea, especialmente na osteoporose, e tem sido citado para a prevenção ou tratamento da osteoporose (Azuma et al., 2013). A vitamina K pode modular certas citocinas envolvidas na remodelação óssea, como OPG e IL6 (interleucina 6), que pode ser um mecanismo adicional pelo qual a vitamina K influencia remodelação óssea (Booth, 2009). Além disso, uma concentração adequada de vitamina K é necessária para reduzir as perdas de íons cálcio via renal (McCormick, 2007).

A vitamina K<sub>2</sub> tem demonstrado ser o mais importante indutor da mineralização óssea em osteoblastos humanos (Plaza & Lamson, 2005). Estudos *in vitro* indicam MK-4 pode aumentar a mineralização óssea e diminuir reabsorção óssea de modo mais eficaz do que filloquinona. (Azuma et al., 2013). Uma série de testes em seres humanos tem demonstrado que a vitamina K<sub>2</sub> é eficaz no tratamento da osteoporose sendo muito mais ativo do que K<sub>1</sub>, quer na formação de osso quer na diminuição de osso, pois a reação de  $\gamma$ -carboxilação é mais extensa. A vitamina K<sub>2</sub> impede a aceleração da reabsorção óssea, mantém estável a formação de osso, reduz a perda óssea, protege contra a perda de massa óssea trabecular e previne a diminuição da força do osso longo (Iwamoto et al., 2006). Assim, a vitamina K<sub>2</sub> pode não só estimular a formação óssea, mas também podem suprimir reabsorção óssea osteoclástica (Iwamoto et al., 2006; McCormick, 2007). Para compreender o funcionamento da vitamina K<sub>2</sub>, foram realizados vários estudos que demonstraram que a vitamina K<sub>2</sub> inibe a osteoclastogênese. Estudos *in vitro* consideram que o mecanismo de inibição osteoclástica exercido pela vitamina K<sub>2</sub> não é devido à toxicidade celular e não afeta a proliferação celular, sendo a sua ação inibitória osteoclástica devido exclusivamente à estrutura da vitamina K<sub>2</sub> (Plaza & Lamson, 2005). Por outro lado, outros estudos *in vitro* se opõem ao anterior referido, afirmando que a vitamina K<sub>2</sub> inibe a reabsorção óssea osteoclástica por induzirem aos osteoclastos a se submeterem à apoptose (Iwamoto et al., 2006; McCormick, 2007).

Resultados recentes de pesquisa indicam que a vitamina K<sub>2</sub> tem benefícios exclusivos sobre a saúde óssea: MK-4 não apenas retarda a perda de massa óssea, mas também reduz o risco de fratura. É ainda demonstrado que promove a tratamento da

fratura, sendo já utilizado como tal no Japão. A vitamina K2 estimula ainda a reabsorção renal de cálcio, ao retardar o aumento dos níveis séricos da PTH, e consequente, a perda óssea (Iwamoto et al., 2006). De acordo com os resultados, a vitamina K2 afeta em maior escala as regiões esponjosas do osso do que os locais corticais (Tasci, Bilgili, Altunay, Gecit, & Keskin, 2011).

#### **4. Marcadores do Metabolismo Ósseo**

Os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo apresentam influência para diagnóstico de condições de remodelação óssea, bem como para a monitorização da resposta à terapêutica, proporcionando uma razão para o seu uso para monitorar o tratamento a longo prazo (Booth, 2009). Um marcador ideal deve ter características específicas: plausibilidade biológica, ou seja, a associação entre o biomarcador e o mecanismo onde este atua deve ter uma explicação plausível, com por exemplo, a relação entre biomarcadores e mecanismos patológicos provocam um aumento da fragilidade do osso. Deve ainda promover uma eficiente associação entre biomarcadores e fratura na população-alvo e, por último, alterações consistentes de suas concentrações em resposta à terapêutica (Terreni & Pezzati, 2012). Os marcadores de remodelação óssea (BTM) são produtos bioquímicos, medidos normalmente na urina ou sangue, que refletem a atividade metabólica do osso. Para prever a perda óssea, devemos medir em um ponto do tempo, a taxa de renovação óssea e o equilíbrio entre formação e reabsorção. Mas, medindo a concentração de BTM (correspondente à relação da sua produção e degradação), não se pode avaliar quantitativamente a proporção da matriz óssea depositada e mineralizada ou destruída, mesmo que alguns estejam ligados mais a marcadores de reabsorção óssea ou formação óssea (ver anexo 3) (Bergmann et al., 2009). É necessário salientar que os próprios marcadores não têm função no controlo do metabolismo ósseo. Eles são tradicionalmente classificados como marcadores de formação óssea ou a reabsorção do osso (Terreni & Pezzati, 2012).

Existem dois tipos de biomarcadores associados ao diagnóstico de patologias

ósseas: marcadores de formação óssea e marcadores de reabsorção óssea (figura 8) (Seibel, 2005; Szulc, 2012). Os marcadores de reabsorção são enzimas osteoclásticas ou produtos de degradação do colagénio, libertados para a circulação. Por outro lado, marcadores de formação são enzimas ou produtos de degradação da síntese de colagénio e proteínas da matriz (Terreni & Pezzati, 2012). Até ao momento não existe um biomarcador que seja uma medida robusta da concentração vitamina K e da sua evolução em patologias ósseas. Em vez disso, na prática clínica corrente utiliza-se uma combinação de vários biomarcadores, onde cada um que reflete um aspeto diferente da ingestão da vitamina K, absorção e transporte, ou funções como um cofator para a  $\gamma$ -carboxilação de VKD (Booth, 2009). Apesar dos marcadores atualmente disponíveis para o turnover ósseo incluírem péptidos enzimáticos e não-enzimáticos derivados de compartimentos celulares e não celulares do osso, eles são geralmente classificados de acordo com o seu processo metabólico. Os marcadores de reabsorção óssea estão relacionados com os produtos da degradação do colagénio tais como hidroxiprolina ou a vários produtos resultantes de ligações cruzadas com colagénio e telopeptídeos. Outros marcadores de reabsorção óssea incluem matriz proteica sem colagénio, tais como sialoproteína óssea (BSP), ou enzimas específicos para osteoclastos como resistente ao tartarato e fosfatase ácida, ou catepsina K (Seibel, 2005).

Em contraste, marcadores de formação óssea ou são subprodutos da neossíntese de colagénio (por exemplo, propeptídeos de colagénio do tipo I), ou proteínas relacionadas com osteoblastos tais como osteocalcina (OC) e fosfatase alcalina (ALP). Para fins clínicos, os marcadores de formação óssea distinguem-se dos índices de reabsorção óssea (Seibel, 2005). No entanto, esta distinção não é tão acentuada e rigorosa, pois alguns componentes dos marcadores podem refletir tanto a formação de osso como a reabsorção óssea (por exemplo, hidroxiprolina e osteocalcina). Além disso, a maioria das moléculas utilizadas como marcadores do metabolismo ósseo estão também presentes em outros tecidos diferentes do osso, e, por isso, podem exercer a sua influência noutros processos fisiológicos não associados ao osso (Seibel, 2005).

Durante a primeira infância, e também a durante a puberdade, os marcadores bioquímicos de remodelação óssea encontram-se em maiores concentrações do que no adulto. Nos homens, entre 20 e 30 anos de idade, os marcadores de remodelação óssea são geralmente maior do que em mulheres da mesma faixa etária. Após os 50 anos, os marcadores de remodelação óssea tendem a aumentar, mas em menor proporção nos homens do que nas mulheres (Seibel, 2005). Neste último caso, o aumento da

remodelação óssea, relacionada com a idade, encontra-se mais pronunciada com a menopausa, quando a reabsorção e formação óssea aumentam cerca de 50-100% (Seibel, 2005).

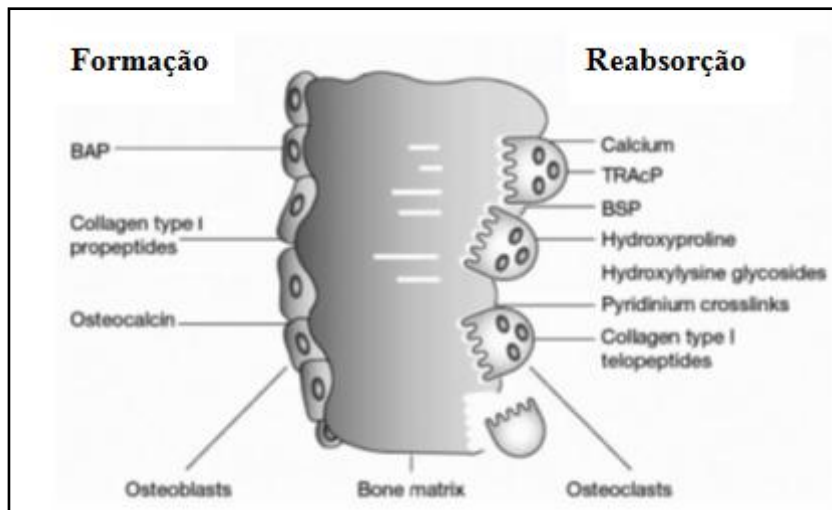


Figura 8: Marcadores de Metabolismo Ósseo, (Seibel, 2005)

Em última análise, as alterações nos marcadores de turnover ósseo não estão associadas a uma doença específica, como a osteoporose, mas reflete, como uma medida absoluta, alterações no metabolismo ósseo, independentemente da sua causa subjacente. Desta forma, os valores das medições de marcadores ósseos devem ser sempre interpretados de acordo com o quadro clínico do doente (Seibel, 2005) .

#### **4.1. Marcadores de formação óssea**

Os marcadores de formação óssea são produzidos a partir de osteoblastos e expressos durante as diferentes fases de desenvolvimento dos osteoblastos (Nishizawa et al., 2013). Todos os marcadores de formação óssea podem ser medidos no soro ou plasma. Eles refletem vários aspetos da função dos osteoblastos e a formação óssea (Nishizawa et al., 2013).

##### **4.1.1. Fosfatase Alcalina (ALP)**

A fosfatase alcalina óssea foi introduzida em uso clínico em 1929. Tem um peso molecular de cerca de 140.000 Da e encontra-se na membrana de osteoblastos. É libertada para a circulação sanguínea durante a formação do osso. Este marcador é

muito estável em amostras de sangue, não sendo afetada pela hemólise. ALP é um enzima que desempenha um papel importante na formação de osteoide e de mineralização. O total sérico da fosfatase alcalina inclui várias isoformas presentes em vários tecidos: fígado, osso, intestino, baço, rim e placenta. Embora seja um indicador de atividade osteoblástica, ALP não é específica para o tecido ósseo e, portanto, não é normalmente utilizada no tratamento e diagnóstico de osteoporose. Porém, níveis elevados de ALP podem ser uma indicação de metástases de cancro para o fígado ou osso (McCormick, 2007).

A função exata do enzima ainda é desconhecida, mas desempenha um papel importante na formação de osteoide e mineralização. Em adultos com função hepática normal, cerca de 50% do total da atividade de AP no soro provem do fígado, enquanto 50% surge a partir do osso. Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para diferenciar entre as duas isoformas principais em circulação, incluindo desnaturação térmica de ALP, eletroforese, precipitação, inibição seletiva e, mais recentemente, imunoensaios. No entanto, como todas as outras técnicas, mesmo esses ensaios mostram um certo grau de reatividade cruzada, cerca de 15-20% entre a fosfatase alcalina produzida no osso e no fígado. Assim, em indivíduos com níveis de fosfatase alcalina elevados, os resultados das medições de DMO pode ser artificialmente elevados, originando um resultado com falso positivo. A isoenzima de fosfatase alcalina, fosfatase alcalina óssea (BAP), é preferencialmente escolhida para detetar alterações do metabolismo ósseo, devido à sua elevada especificidade e de baixo custo. (Seibel, 2005). Fosfatase alcalina óssea é um enzima localizado na superfície exterior dos osteoblastos. É um dos principais reguladores da mineralização da matriz óssea. (Szulc, 2012).

#### **4.1.2. Osteocalcina (OC)**

A osteocalcina é um grande péptido sintetizado por osteoblastos, odontoblastos e alguns condrócitos (Nishizawa et al., 2013; Seibel, 2005; Terreni & Pezzati, 2012). Liga-se à hidroxiapatite e é depositado na matriz óssea. É expressa, principalmente, durante a fase de formação do osso e tem um comprimento 5.8 kDa. Apesar de OC ter sido descoberta em 1976, a sua função ainda não foi bem elucidada. Dados experimentais recentes sugerem OC que pode ser uma hormona sintetizada por osteoblastos e envolvidos na regulação da secreção de insulina e regulação do metabolismo de hidratos de carbono (Szulc, 2012).

Uma das principais características do OC é ser VKD, com resíduos ácido gama-carboxiglutâmico (GLA), os quais são responsáveis pelas propriedades de ligação do cálcio da proteína. Na sua porção carboxi-terminal, osteocalcina também pode interagir com outras proteínas, incluindo recetores da superfície celular da matriz óssea, pois osteocalcina apresenta uma função ativa na organização da matriz extracelular óssea (Seibel, 2005).

No entanto, este péptido é facilmente sujeito a uma rápida degradação plasmática, de modo que ambos os péptidos intactos e vários fragmentos de OC de diferentes tamanhos coexistem em circulação sanguínea. A presença em quantidade variável de diferentes fragmentos torna difícil a determinação analítica deste marcador. Além disso, uma vez OC é incorporada na matriz óssea, investigadores sugerem que os fragmentos podem ser libertados OC mesmo durante a reabsorção óssea (Seibel, 2005). Como fragmentos de OC são libertados a partir da matriz óssea, durante a reabsorção óssea, os ensaios para determinação da OC em circulação refletem os seus fragmentos tanto de formação como reabsorção óssea não apresentando, por isso, especificidade na determinação. Apenas uma pequena fração de OC é libertada para a circulação sanguínea seguindo um ritmo circadiano, atingindo um pico plasmático às 4h da manhã. A restante fração é eliminada via renal e sua clearance é afetada em situações de insuficiência renal (Bergmann et al., 2009; Terreni & Pezzati, 2012). A OC tem um tempo de semi-vida inferior a uma hora e, por isso, é degradada rapidamente (Terreni & Pezzati, 2012). Clinicamente, OC é considerada como um marcador específico para a função osteoblástica e reflete o metabolismo de turnover ósseo. (Szulc, 2012). Porém, OC não é um marcador legítimo da função dos osteoblastos (Bergmann et al., 2009). Estima-se que, logo após a sua libertação a partir de osteoblastos, a maior parte da proteína sintetizada de novo é incorporada novamente dentro da matriz óssea extracelular, onde constitui aproximadamente 15% da fração proteica sem colagénio. A fração menor é libertada para a circulação sanguínea por uma reabsorção óssea osteoclástica, onde pode ser detetada por imunoensaios. Porém, a sua determinação sérica é difícil devido à presença de uma quantidade variável de vários fragmentos, e essencialmente por uma falta de padronização uniforme de leitura (Seibel, 2005; Szulc, 2012).

#### **4.1.3. Procolágeno tipo I**

O procolagénio I é derivado de colagénio do tipo I, a forma de colagénio mais abundante encontrada no osso. O colagénio tipo I também está presente em outros tecidos tais como a pele, dentes, córnea, vasos sanguíneos, fibrocartilagem e nervos (Seibel, 2005). Colagénio do tipo I é sintetizado por osteoblastos que é a molécula precursora procolagénio, caracterizados por terminais de extensão de pequenos peptídeos: propéptido (N-) aminoterminal (PINP) e o propéptido (C-) carboxiterminal (PICP). Estas extensões são clivadas por peptidases durante metabolismo de colagénio extracelular, quando o colagénio é depositado para formar a matriz óssea, produzindo assim PINP e PICP que também podem ser efetuadas determinações séricas (Lee & Vasikaran, 2012; Nishizawa et al., 2013). O catabolismo de ambos os peptídeos de extensão está sob controlo hormonal, mas a sua concentração não é dependente da função renal (Bergmann et al., 2009). PICP tem um peso molecular de 115 kDa, é estabilizado por pontes de dissulfureto, metabolizado pelo fígado e, portanto, tem um tempo de semi-vida curto, cerca de 6-8 minutos. Por outro lado, PINP tem um peso molecular de apenas 70 kDa, é rica em prolina e hidroxiprolina, e é eliminada da circulação pelas células endoteliais do fígado. (Seibel, 2005; Terreni & Pezzati, 2012).

Eles representam um marcador da síntese de colagénio do tipo I. PINP intacta é metabolizada principalmente através do fígado. A medição de PINP tem como vantagem uma baixa variabilidade diurna, e seus níveis em circulação não são significativamente influenciados pela ingestão de alimentos, ou seja, o doente não precisa de estar em jejum para efetuar a sua determinação sérica (Terreni & Pezzati, 2012). Como desvantagem, PINP é rapidamente degradada a 37°C (Bergmann et al., 2009). Embora a relevância clínica da PICP na avaliação de doenças ósseas metabólicas é visto ainda com algum ceticismo, a concentração de PINP no plasma parece ter maior validade de diagnóstico. Porém, a concentração sérica de PINP é diretamente proporcional à quantidade de colagénio novo produzida por osteoblastos. (McCormick, 2007). Do ponto de vista prático, a termoestabilidade dos pró-peptídeos é uma vantagem, uma vez que o transporte e tempo de armazenamento são bem tolerados, sem perdas significativas do sinal (Seibel, 2005). Estes péptidos seguem um ritmo circadiano apresentado concentrações mais elevadas no início da manhã (Bergmann et al., 2009).

## **4.2. Marcadores de Reabsorção Óssea**

Marcadores de reabsorção óssea refletem a atividade osteoclástica no processo de remodelação óssea. A atividade osteoclástica acelerada aumenta a remodelação óssea e está associada à baixa massa óssea (McCormick, 2007). Excetuando o tartarato resistente à fosfatase ácida, a maioria de marcadores de reabsorção óssea são produtos de degradação de colagénio proveniente do osso.

### **4.2.1. Hidroxiprolina (OHP)**

A hidroxiprolina é um aminoácido comum, característica de todas as formas de colagénio. A medição da excreção urinária de hidroxiprolina é o ensaio mais antigo de reabsorção óssea. (Terreni & Pezzati, 2012). OHP é formada intracelularmente a partir da hidroxilação de prolina e constitui 12-14% do teor total de aminoácidos com colagénio. 90% de OHP é libertado durante a degradação do colagénio ósseo e é metabolizado maioritariamente no fígado. Posteriormente, é excretado na urina, onde pode ser detetado por métodos colorimétrico ou por HPLC, quer na fração livre ou ligada a péptidos. OHP urinário é normalmente considerado marcador de reabsorção óssea, apesar de ser um marcador inespecífico da reabsorção de colagénio (Seibel, 2005).

### **4.2.2. Glicosídeos de Hidroxilisina**

Os Glicosídeos de Hidroxilisina surgem durante a síntese de colagénio e ocorrem em duas formas: a glicosil-galactosil-hidroxilisina (GGHL) e galactosil-hidroxilisina (GHL). Ambos componentes são libertados para a circulação sanguínea durante a degradação de colagénio e pode ser medido na urina por HPLC. A vantagem da hidroxilisina face à hidroxiprolina é que as suas formas glicosiladas não são metabolizadas e não são influenciadas por componentes provenientes da dieta. Além disso, GGHL está presente em pele, enquanto GHL encontra-se especificamente no osso. Embora as hidroxilisinas tenham um potencial como marcadores de reabsorção óssea, a sua principal desvantagem baseia-se na ausência de um imunoensaio específico para ser detetado (Seibel, 2005).



#### **4.2.3. Ligações cruzadas piridínicas: desoxipiridinolina (DPD) e piridinolina (DYP)**

As ligações cruzadas entre os resíduos de aldeído, lisina e hidroxilisina são formadas entre as moléculas de colagénio para estabilizar o tecido conjuntivo. Eles encontram-se na matriz de colagénio (tipos I, II e III) de muitos tecidos e refletem apenas a degradação do colagénio. São libertados na circulação sanguínea e excretados na urina quando o colagénio é catabolizado (Bergmann et al., 2009)

Piridinolina (PYD) e desoxipiridinolina (DPD) são formadas durante a maturação extracelular e, por isso, provêm da reabsorção óssea (Bergmann et al., 2009). Durante a reabsorção óssea, as ligações com colagénios são quebradas através de proteólise e os componentes resultantes desta quebra são libertados para a circulação sanguínea e urina (Nishizawa et al., 2013; Seibel, 2005). Os ensaios estão atualmente disponíveis medem amostras do soro e urina. Estes marcadores seguem um ritmo circadiano sendo mais elevada no início da manhã e são pouco influenciados pela ingestão de alimentos, uma vez que nem PYD nem DPD são adquiridos a partir da dieta e, portanto, é altamente específico para o tecido ósseo. (Bergmann et al., 2009; Terreni & Pezzati, 2012). Esta é a medida mais representativa da reabsorção óssea (Bergmann et al., 2009). Enquanto PYD é encontrado na cartilagem, osso, ligamentos e vasos, DPD é quase encontrada exclusivamente no osso e dentes (Bergmann et al., 2009). Como o osso tem maior turnover que a cartilagem, ligamentos, vasos ou tendões, as quantidades de PYD e DPD e no soro ou urina são principalmente derivados do osso. Assim, DPD e DYP são atualmente considerados como os melhores índices de avaliação da reabsorção óssea (Bergmann et al., 2009). Existem técnicas automatizadas disponíveis para a medição na urina e no soro. A análise de urina por HPLC evidencia que a DPD está presente sob a forma livre (cerca de 40%) e numa forma de péptido ligado (cerca de 60 %), cujas percentagens variam de acordo com a patologia óssea. Assim, para determinação quantitativa destes marcadores, os imunosensaio são amplamente utilizados (Nishizawa et al., 2013; Seibel, 2005).

#### **4.2.4. Telopéptido do colagénio tipo I: telopéptido da região carboxiterminal do colagénio tipo I (CTX) e telopéptidos da região aminoterminal do colagénio tipo I (NTX)**

Os NTX-I, CTX-I, e ICTP são misturas de produtos de catabolismo de colagénio tipo I. Os péptidos acima são catabolizados em moléculas mais pequenas, nas células tubulares renais. Embora ICTP (telopéptido carboxilo trimérico) seja um produto do catabolismo do colagénio ósseo semelhante ao CTX-I ou de NTX-I, não é um bom marcador de reabsorção óssea na pós-menopausa (Szulc, 2012). Estes péptidos são da região não-helicoidal de colagénio do tipo I e são produzidos por osteoclastos durante a reabsorção óssea. NTX e CTX podem ser medidos tanto no soro como na urina (Lee & Vasikaran, 2012). Os níveis séricos são influenciados pelo ritmo circadiano e ingestão de alimentos e, portanto, as amostras devem ser recolhidas num determinado momento do dia, de preferência de manhã e em jejum. O ensaio sérico automatizado do CTX tornou-se cada vez mais disponível e está a substituir o NTX urinário devido à sua simplicidade e robustez (Terreni & Pezzati, 2012). Os níveis séricos de CTX seguem um ritmo circadiano e são mais elevados no início da manhã (Bergmann et al., 2009).

Uma diminuição no NTX, especialmente durante a monitorização da terapêutica, pode ser usada como um medidor precoce da redução da reabsorção óssea, com a estabilização ou aumento da massa óssea em resposta ao tratamento. NTX é mais sensível a alterações no metabolismo ósseo do que é DPD, o que permite avaliar a eficácia terapêutica com maior consistência (McCormick, 2007).

#### **4.2.5. Sialoproteína óssea (BSP)**

A BSP é uma glicoproteína fosforilada com um peso molecular de 70-80 kDa, o que corresponde a 5-10% da matriz não colagenosa do osso. É um importante produto sintético de osteoblastos e odontoblastos, mas foi também encontrado em osteoclastos e células de linhagem com evolução maligna metastática. Estudos demonstram que BSP sérico está relacionado com a reabsorção óssea. Por conseguinte, a BSP é detetada principalmente nos tecidos mineralizados, tais como osso, da dentina e na cartilagem. BSP contém Arg-Gli-Asp (RGD), uma sequência de reconhecimento da proteína Integrina que melhora a fixação dos osteoblastos e osteoclastos a superfícies de plástico, liga-se preferencialmente à cadeia  $\alpha 2$  de colagénio e intervém diretamente na formação de cristais de hidroxiapatite, *in vitro*. Estudos realizados demonstram que a sialoproteína melhora a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos e desempenha um papel

importante nos processos de adesão da matriz celular e na organização molecular da matriz extracelular de tecidos mineralizados. Vários estudos permitiram desenvolver imunoenaios para a medição de BSP no soro, onde é detetado apenas uma pequena fração biodisponível de BSP no soro (Seibel, 2005).

#### **4.2.6. Marcadores do número de osteoclastos: fosfatase ácida tartrato-resistente (TRAP, TRAcP 5b)**

Os osteoclastos produzem uma isoenzima da fosfatase ácida, que não é inibida pelo tartarato, designada de fosfatase ácida tartarato resistente banda 5b (TRAP 5b). Este enzima está presente em osteoclastos, na membrana celular e no espaço de reabsorção. Aumento dos níveis de TRAP 5b foram associados a um estado de elevada remodelação óssea alta, como a doença de Paget e metástases ósseas. Recentemente, devido à evolução do ensaio, TRAP-5b está-se a tornar-se um dos BTM mais usados para a previsão de renovação óssea alta significativamente relacionada com a perda de DMO. Existem poucos estudos sobre o tipo TRAP-5b afetado em pacientes com osteoporose (Terreni & Pezzati, 2012).

Este enzima pertence à família da fosfatase ácida, dos quais existem pelo menos 5 isoformas diferentes. Estas isoformas são expressas em diferentes tecidos e células tais como próstata, osso, baço, as plaquetas, os eritrócitos, e macrófagos. Todas as fosfatases ácidas são inibidas por L (+)-tartarato, exceto banda 5 e, por isso, foi denominada fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP ou TRAcP). Destas últimas, 2 subformas, 5a e 5b são conhecidos, e pesquisas recentes têm mostrado que a TRAP-5b é característica de osteoclastos. A origem TRAP-5a é desconhecida, mas pode ser expressa por macrófagos. As duas isoformas 5a e 5b são diferentes: a isoforma 5a que contém ácido siálico, enquanto 5b não. Mais recentemente, em imunoenaios específicos para TRAP-5b indicam que este marcador pode ser útil para avaliar a atividade osteoclástica. Para ensaios convencionais com TRAP, devem ser tomados cuidados acrescidos para estabilizar o enzima pois, após flebotomia, esta perde mais de 20% da sua atividade por hora, à temperatura ambiente. Porém, esta situação pode ser evitada se for adicionado tampão de citrato à amostra (Seibel, 2005). TRACP-5b é um enzima lisossomal contendo ferro sintetizado pelos osteoclastos, que pode funcionar como uma fosfatase ácida (Szulc, 2012). Os osteoclastos produzem um isoenzima da fosfatase ácida, que não é inibida por TRAP-5b. TRAP total, medido por métodos

químicos, tem sido considerado como um marcador da reabsorção óssea. No entanto, a TRAP total é influenciada por enzimas provenientes dos eritrócitos e plaquetas, e sua dosagem pode ser dificultada pela existência de inibidores em circulação no sangue (Bergmann et al., 2009).

#### **4.2.7. Catepsina K**

A catepsina K sérica apresenta grande interesse clínico pois é o principal enzima proteolítico usada pelos osteoclastos para a degradar o colagénio tipo I durante reabsorção óssea. Apesar de vários estudos sugerem que ela pode ser um valioso marcador da reabsorção óssea, são necessários mais estudos para avaliar o seu desempenho (Terreni & Pezzati, 2012). A catepsina K é uma protease cisteína lisossômica expressa abundantemente nos osteoclastos (Suzuki et al., 2008). A sua relevância clínica surgiu com a descoberta de picnodisostose<sup>3</sup>, uma doença autossômica recessiva resultantes de mutações no gene de catepsina K. Uma vez que a catepsina K ser expressa e segregada pelos osteoclastos durante a reabsorção óssea ativa, a catepsina K pode ser um marcador bioquímico útil e específico na avaliação da atividade dos osteoclastos (Seibel, 2005).

#### **4.2.8. Homocisteína**

A homocisteína apresenta uma ação direta sobre a matriz óssea e é atualmente conhecida por aumentar a atividade osteoclástica e diminuir a atividade osteoblástica. A homocisteína liga-se diretamente à matriz extracelular e reduz a força e resistência do osso. O seu mecanismo de remodelação óssea ocorre via mitocondrial. Estudos recentes demonstram que a homocisteína exerce um efeito negativo sobre o osso através de diminuição do fluxo sanguíneo no osso, aumentando as espécies reativas de oxigênio (ROS) e um aumento da metaloproteinases da matriz (MMP) que degradam a matriz óssea extracelular (Vacek, Kalani, Voor, Tyagi, & Tyagi, 2013).

Outro marcador importante, relacionado com estudos de homocisteína no osso é  $\beta$ -catenina. Foi observado que este marcador regula a homeostase óssea. Esta proteína sinaliza a homocisteína e desempenha um papel importante no metabolismo ósseo,

---

<sup>3</sup> Picnodisostose: (também conhecida síndrome de Maroteaux-Lamy) é uma doença genética rara. Trata-se de uma displasia óssea. É uma forma autossômica recessiva de nanismo. Esta doença é provocada por um defeito num gene que codifica o enzima N-acetilgalactosamina-4-sulfatase.

controlando a diferenciação de células osteoblásticas e osteoclásticas. Foi sugerido, em estudos *in vitro*, que os níveis de homocisteína podem provocar apoptose por formação de ROS (espécies reativas de Oxigênio) via mitocondrial. Desta forma, existem evidências de que a homocisteína pode contribuir para o desenvolvimento da osteoporose através da redução óssea formação e que esta pode ser determinada pela determinação de  $\beta$ -catenina (Vacek et al., 2013).

#### **4.3. Breves considerações sobre a recolha de amostras para determinação da concentração de marcadores de remodelação óssea (BTM)**

##### **➤ Urina**

Por conveniência, a medição de marcadores ósseos em urina é geralmente realizada quer na 1ª hora da manhã ou em 2h de colheita, devido às variações das concentrações diurnas. Em cada caso, os valores devem ser ajustados para a creatinina urinária. A clearance creatinina tem sido relatada a ser constante ao longo do tempo (variações de 10%) e correlacionar com a massa corporal, mas também há relatos que sugerem que a correção para a creatinina em uma amostra de urina pode ser ilusória. Alternativamente, a taxa de excreção do marcador pode ser determinado com a colheita de urina 24h (Terreni & Pezzati, 2012).

Os marcadores de turnover ósseos mostram variações diurnas significativas, com valores mais elevados nas primeiras horas da manhã e os menores valores durante a tarde e noite, tanto para concentrações urinárias como séricas. Os níveis dos marcadores urinários podem ainda variar até 30% durante o dia (Terreni & Pezzati, 2012).

Assim, controlar o tempo de colheita da amostra é uma necessidade para todos os tipos de marcadores. Ao comparar os valores séricos e de urina evidencia-se que existe uma variação de 20 a 30% e geralmente são alterações menos pronunciadas durante o dia do que os índices de base urina (Seibel, 2005). Além disso, os efeitos da alimentação devem ser considerados em determinados marcadores bioquímicos. Na determinação sérica de CTX, os valores são influenciados pela ingestão de alimentos, e as amostras para este marcador necessita de ser feita no estado de jejum. Por exemplo, a ingestão de alimentos ricos em hidroxiprolina, como carne irá afetar as medições de OHP na urina. É portanto, necessário para instruir os pacientes a estar em uma dieta livre de colagénio pelo menos 24 horas antes da colheita da urina para medidas de OHP.

Contrariamente, a determinação de DPD, o NTX e o CTX na urina e no soro não é afetada pela ingestão de colagénio (Seibel, 2005).

O efeito de exercício físico intenso imediatamente antes da flebotomia para marcadores de turnover ósseo pode elevar 30-40% do seu valor basal (Seibel, 2005). No que diz respeito a conservação da amostra, a osteocalcina e a fosfatase ácida são os marcadores mais difíceis de manusear. Por outro lado, os peptídeos de colagénio e fosfatase alcalina são muito mais resistentes à degradação. Piridinolina é sensível à luz e degrada sob a influência de radiação UV intensa, ao contrário da concentração urinária NTX e CTX, que não é afetada pela luz UV (Bergmann et al., 2009; Seibel, 2005).

#### ➤ **Sangue**

As amostras de sangue devem ser colhidas no início da manhã, em jejum. Um aumento na ingestão de cálcio dietético pode diminuir os níveis de marcadores de reabsorção óssea, especialmente em pessoas cuja ingestão de cálcio anteriormente era baixa. Presume-se que este efeito é mediado pela inibição da paratohormona (PTH) (Terreni & Pezzati, 2012).

#### **4.3.1. Marcadores Séricos vs Urina**

Muitos estudos têm demonstrado que a variabilidade intra-individual é de cerca de 10% para os marcadores do soro e entre 15% e 25% para os marcadores de urina (Bergmann et al., 2009).

O LSC, definido como a diferença que reflete uma mudança real, com 5% de possibilidade de erro tipo 1 (falso-positivo). Assim, para um coeficiente de variação de 10%, uma variação de, pelo menos, 25-30% devem ser observados para os marcadores séricos para ponderar que há uma evolução significativa, enquanto a mudança de 40-70% é necessário para os marcadores de urina. No entanto, é preciso estar ciente do risco de erro de tipo 2 (falso negativo), e deve ser evitado para mudar o tratamento com base em uma evolução insuficiente, pelo menos em apenas duas medidas sequenciais (Bergmann et al., 2009)

Além dos parâmetros de exclusão do ensaio fatores tais como a escolha da amostra (por exemplo, soro versus urina), modo de recolha da amostra (por exemplo, colheita de urina de 24 horas versus 1ª urina da manhã), a preparação adequada do paciente (por exemplo, dieta pré-amostragem / jejum / exercício antes flebotomia), o

correto manuseio, processamento e armazenamento das amostras deve ser sempre considerado (Seibel, 2005). Para evitar erros de diagnóstico clínico, os médicos que usam marcadores bioquímicos de remodelação óssea, devem conhecer os fatores que influenciam BTM e, por sua vez, prever os resultados do ensaio. Os fatores biológicos mais importantes são variabilidade diurna e diária nas atividades de formação óssea e de reabsorção óssea (Szulc, 2012).

Muitos estudos têm demonstrado que a variabilidade intra-individual é cerca de 10% de marcadores séricos e de 30% para os marcadores urinários, e a relação sinal-ruído é melhor para os marcadores do soro, pelo que as amostras de soro são as preferidas face às amostras de urina quando se mede BTM (Terreni & Pezzati, 2012). A medição de marcadores de remodelação óssea (BTM) atualmente não está incluído no algoritmo para cálculos de risco de fratura, devido à falta de dados. No entanto, BTM pode ser útil para monitorar o tratamento da osteoporose (Lee & Vasikaran, 2012).

## **5. Osteoporose**

A osteoporose é uma doença caracterizada por uma diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, conduzindo ao aumento da fragilidade óssea e consequente aumento do risco de fratura (Lee & Vasikaran, 2012; Suzuki et al., 2008). O consenso NIH (“Consensus Panel National Institutes of Health”) define osteoporose como um distúrbio ósseo que é caracterizada pela resistência óssea comprometida e predispõe uma pessoa a um aumento do risco de fratura. Isso faz com que idade um importante preditor da doença. O consenso de NIH propôs que a força do osso está relacionada com muitos fatores, nomeadamente a mineralização óssea, arquitetura, turnover ósseo e a concentração de proteínas orgânicas (Heiss et al., 2008).

O desequilíbrio entre a formação e os resultados de reabsorção do osso promove o desenvolvimento de osteoporose (Suzuki et al., 2008). Osteoporose é uma doença silenciosa com impacto na saúde e economia. A consequência mais grave desta doença é a fratura, para os quais indivíduos com osteoporose têm um risco aumentado, em particular os idosos, cuja fratura do fémur acarreta consequências mais graves, com aumento da morbilidade e mortalidade, bem como aumento da necessidade de cuidados

de longo prazo. O impacto da osteoporose está projetada para aumentar de forma exponencial devido ao envelhecimento da população (Lee & Vasikaran, 2012).

A osteoporose óssea é uma doença poligénica, associada a uma desordem metabólica (McCormick, 2007). A osteoporose é um problema de saúde pública recorrente na prática clínica. É a doença óssea metabólica mais comum, sendo caracterizada por uma redução tanto da quantidade como da qualidade óssea e, portanto, está associada a um aumento da suscetibilidade de fraturas ósseas. Surge principalmente após os 50 anos, com igual incidência em ambos os sexos (Bergmann et al., 2009; McCormick, 2007).

Osteoporose é definida por um valor de DMO, medido pela dupla energia de absorção de raios X (DEXA) na coluna ou fémur, mais de 2,5 SD abaixo dos valores máximos normais para adultos jovens (T-score < -2.5) (critérios da OMS) ou pela ocorrência de uma fratura ligeira (Bergmann et al., 2009; McCormick, 2007).

## **5.1. Fisiopatologia**

A osteoporose é uma doença esquelética caracterizada pelo comprometimento da resistência óssea que predispõe a pessoa a um risco aumentado de fraturas. A força óssea reflete principalmente a integração da densidade óssea e da qualidade do osso. A qualidade óssea refere-se a arquitetura, a rotatividade, a acumulação de dano, como microfraturas, e mineralização. As manifestações clínicas mais comuns da osteoporose são as fraturas do fémur, vértebras ou pulso (Sangkomkamhang et al., 2010).

### **1.1.1. Fatores de risco para desenvolvimento da doença**

A patogénese da osteoporose é multifatorial. Assim, o risco de fratura depende de vários fatores de risco independentes (ver anexo 2). Uma diminuição de BMD, anteriores fraturas por fragilidade, idade e história familiar predispõem ocorrência de fraturas. Embora a DMO é usada para definir o limiar de diagnóstico, o limiar para intervenção farmacológica e o risco absoluto de fratura por fragilidade são resultado das influências independentes dos vários fatores de risco. Em osteoporose adulta, diferentes fatores podem influenciar diretamente a BMD (género, a ingestão de cálcio, atividade física, idade da menopausa), ou propensão a quedas (deficiência física, estímulos ambientais, o álcool consumo, fármacos tais como as benzodiazepinas ou



diuréticos) ou ambos (idade, ingestão de álcool, tabagismo, baixo peso corporal, deficiência de vitamina D). Por outro lado, a componente genética tem uma forte influência na determinação da BMD e microarquitetura óssea. Apesar de vários polimorfismos terem sido associados a baixa DMO e aumento do risco de fraturas de baixa energia, eles representam apenas 30% da variabilidade da DMO. Assim, eles não podem ser tidos em conta para a definição do risco de fratura (Cianferotti & Brandi, 2012). Estudos realizados mostram que uma reduzida mobilidade e contração muscular conduzem a um aumento do risco de desenvolver osteoporose (Kolios et al., 2011). Devido à falta de exposição mecânica do sistema músculo-esquelético, o tecido ósseo tende a enfraquecer. O déficit de calcitriol conduz ao aumento de PTH que induz a decomposição de cálcio no osso. As baixas concentrações de calcitriol e elevadas PTH são parâmetros importantes no diagnóstico e tratamento de osteoporose (Kolios et al., 2011). Um decréscimo da integridade da saúde óssea pode decorrer devido a condições ambientais adversas, como tabagismo, sedentarismo, ou inflamação gastrointestinal e má absorção, no entanto, para um paciente em risco de fratura por fragilidade, a terapia nutricional estratégico pode ter um impacto importante na melhoria da saúde dos ossos. Embora as estimativas sugiram que 50 % da variação no pico a massa óssea é devido à genética, estima-se que 30-50 % dos fatores genéticos que influenciam a força do osso pode ser afetada pelo ambiente em que o osso se encontra (McCormick, 2007).

### **1.1. Causas secundárias da osteoporose:**

Algumas das causas secundárias da osteoporose são incluídas no cálculo de risco de desenvolvimento da doença, como o uso de glicocorticóides e artrite reumatoide. O tratamento com glucocorticoides leva a uma diminuição nos marcadores de formação óssea e um aumento nos marcadores de reabsorção óssea. Os marcadores de reabsorção óssea encontram-se aumentados na artrite reumatoide. Outras condições associadas à osteoporose, tais como hiperparatireoidismo primário e tireotoxicose<sup>4</sup>, também estão associados a um aumento da remodelação óssea (Lee & Vasikaran, 2012).

---

<sup>4</sup> Tireotoxicose: Condição clínica caracterizada por excesso de hormonas tiroideas em circulação sanguínea

### **5.3. Subtipos de osteoporose**

**5.3.1. Osteoporose masculina:** Embora a osteoporose nos homens é agora reconhecida como um importante problema de saúde e é frequentemente diagnosticada. Estima-se que 20% das fraturas da anca em homens e a prevalência de fraturas vertebrais é a metade da prevalência estimada para as mulheres. Além disso, as fraturas provocadas por fragilidade em homens produzem maior morbidade e mortalidade. A maioria dos casos de osteoporose masculina (2/3) é considerada como tendo uma causa secundária, como o hipogonadismo, abuso de álcool, múltipla mieloma, exógena ou endógena excesso de glicocorticóides, má absorção, hiperparatireoidismo primário. A osteoporose secundária ocorre em dois terços dos homens, mais de 50% das mulheres na pré-menopausa e cerca de um quinto das mulheres na pós-menopausa (Cianferotti & Brandi, 2012). Há algumas diferenças entre a osteoporose masculina e feminina que é importante destacar: a relação entre DMO baixa e o risco de fratura é menos evidente; a prevalência de fatores de risco e de causas secundárias é elevada abaixo dos 65 anos; tal como descrito para o sexo feminino, há fatores de risco reconhecidos para osteoporose no sexo masculino (Nishizawa et al., 2013; Tavares et al., 2007)

**5.3.2. Osteoporose induzida por glucocorticóides:** A perda óssea dependente da dose rápida (até 15%), particularmente no local trabecular, ocorre nos primeiros 6-12 meses após o início da corticoterapia. O risco de fratura é aumentado só depois 3 meses de tratamento e continua a aumentar até 20 vezes. O risco de fratura diminui rapidamente quando o tratamento é interrompido. O risco de fratura durante a terapia com glucocorticóides é significativamente maior do que o risco estimado pelos valores de BMD correspondentes (Cianferotti & Brandi, 2012).

**5.3.3. Hiperparatireoidismo primário (PHPT):** Perda óssea em PHPT ocorre principalmente ao nível do osso cortical. Paratireoidectomia é o único tratamento curativo para esta doença. O aumento do risco de fratura documentado durante a doença ativa volta ao normal após a cirurgia. Todos os pacientes com PHPT devem ser aconselhados a manter a ingestão de cálcio normal e a deficiência de vitamina D, geralmente associada com uma maior gravidade da doença esquelética, deve ser previamente corrigida (Cianferotti & Brandi, 2012).

**5.3.4. Osteoporose devido ao tratamento do cancro:** Os inibidores de aromatase e análogos de GnRH são amplamente utilizados para induzir hipogonadismo após a cirurgia de cancro da mama e da próstata. Estes fármacos causam uma perda óssea significativa, associada a um aumento do risco de fratura (Cianferotti & Brandi, 2012).

**5.3.5. Osteogenesis imperfecta (OI):** OI é uma doença genética devido a um defeito na produção de colagénio tipo I com a alteração estrutural no tecido esquelético. Entre as oito diferentes formas, o tipo I é a forma mais frequente. Esta patologia sofre múltiplas fraturas por fragilidade desde tenra idade e que pode ser diagnosticada como a osteoporose juvenil de uma origem genética diferente. OI tipo 3 é mais grave e caracteriza-se por fraturas múltiplas dos ossos longos, o que resulta em múltiplas deformidades (Cianferotti & Brandi, 2012).

## **5.4. Métodos de Diagnóstico**

Na prática clínica é utilizado medições da BMD para determinar risco relativo de uma mulher poder vir a desenvolver osteoporose, com subjetiva atenção dada a outros fatores de risco. As medições da DMO são não invasivas, com local específico, e são suficientemente sensível para medir as mudanças na densidade óssea. No entanto, elas são dispendiosas e têm um número limitado de amostras (Sachdeva et al., 2005). Uma em cada duas mulheres adultas tem detetado baixo DMO, que é 10 vezes mais comuns e mais grave em mulheres do que em homens. Mulheres caucasianas são 50% mais propensas a ter uma fratura associada à osteoporose. Em um ano, mulheres com osteoporose tem quatro vezes mais o risco de sofrer uma fratura como aqueles com os ossos saudáveis, e a taxa de fraturas em mulheres com baixa densidade óssea é o dobro das mulheres com ossos normais (Godfrey & Rosen, 2008). O diagnóstico da osteoporose baseia-se na avaliação quantitativa da densidade mineral óssea (DMO), geralmente por absorção dupla de raios X (DEXA). Associado a BMD, utilizam um algoritmo que representa uma mudança considerável na avaliação de risco, que se deslocam de risco relativo, como determinado por medição de valores derivada de densitometria de duplo feixe de raios- x (DEXA) de para um T-score de risco, que determina a probabilidade de que um fratura relacionada com a osteoporose irá ocorrer

dentro dos próximos 10 anos (Godfrey & Rosen, 2008). Em vez de usar BMD para avaliar a perda óssea de um paciente, um T-score é usado para converter este valor  $\text{g/cm}^2$ . Este método permite ainda avaliar a prevalência de osteoporose dentro de uma população (McCormick, 2007).

Em suma, é necessário um marcador substituto necessária para confirmar a eficácia do tratamento. As alterações na DMO e BTM após o início do tratamento da osteoporose independente correlacionam-se com a redução do risco de fratura. Além disso, as alterações da DMO são menores ocorrem de forma mais lenta que as alterações na BTM. Por outro lado, BTM mostram alterações significativas após 3-6 meses do início da terapêutica. O objetivo da terapia é reduzir os níveis de BTM para valores presente antes da menopausa. Há também a necessidade de monitorização de BTM durante a terapia antiosteoporótica que irá melhorar adesão e os resultados da fratura (Lee & Vasikaran, 2012).

### **5.5. Fraturas Osteoporóticas**

A vitamina K é o único nutriente que está significativamente correlacionado com incidência de fraturas (Suzuki et al., 2008). Na avaliação do risco de fratura deve incluir BMD, história de fraturas anteriores, os marcadores do metabolismo ósseo, a idade e o risco de queda (Nishizawa et al., 2013). A qualidade óssea tornou-se uma questão importante na prevenção da osteoporose, porque o BMD não é o único fator que afeta a ocorrência de fraturas (Sogabe et al., 2011).

As fraturas osteoporóticas, particularmente do cólon femoral e do corpo vertebral, prejudicam a qualidade de vida do utente e aumentam o índice de mortalidade. Em estudo americano, as mulheres de 50 anos de idade, têm probabilidade de 40% de sustentar uma extremidade proximal fratura do fémur, fratura do corpo vertebral, ou distal fratura braço em algum momento durante o resto de sua vida (valor correspondente para os homens, 13%). As fraturas do fémur foram o tipo mais comum de fraturar no presente estudo, em contraste, na melhor das hipóteses, fraturas no antebraço foram mais comuns (Hadjji et al., 2013).

As fraturas osteoporóticas afetam com maior frequência as mulheres pós-menopáusicas e os indivíduos idosos e representam um grave problema de saúde pública devido à sua elevada prevalência, às consequências médicas que acarretam, à

diminuição da qualidade de vida e aos custos económicos e sociais que comportam (Sangkomkamhang et al., 2010). As fraturas osteoporóticas resultam, em regra, de traumatismos de baixa energia, a maioria das vezes causados por uma queda no mesmo plano. A correta abordagem da osteoporose deve ter como principal objetivo a redução das fraturas através, não só da manutenção da resistência óssea, para obter um bom valor de DMO e prevenindo a perda óssea acelerada, com também reduzindo ou eliminando os fatores que contribuem para uma maior propensão de quedas nos idosos. Estudos demonstram que a vitamina K diminui a incidência de fratura e que tem um papel importante na regulação da remodelação óssea, incluindo a formação óssea (Sangkomkamhang et al., 2010). A deficiência vitamina K desencadeia um aumento do risco para o desenvolvimento de osteoporose (Suzuki et al., 2008).

Embora a mineralização da matriz de colagénio contribui significativamente para a resistência óssea (rigidez e resistência a falhas estruturais) e uma baixa densidade de massa óssea está associada com risco aumentado de fratura, DEXA por si só, não é um indicador preciso da força óssea. Aspetos de qualidade do osso, tais como tamanho, forma, integridade das fibras de colagénio, espessura e conexão de trabéculas, e a taxa de renovação óssea também afetam a força total do osso. Por este motivo, o termo "fragilidade óssea" é utilizado para enfatizar a importância de ambos os aspetos quantitativos e qualitativos de osso na determinação do risco de fratura (McCormick, 2007). A fragilidade óssea está associada a múltiplos fatores de risco, entre o mais importante a idade, sexo feminino, baixo peso, baixa DMO, fratura por fragilidade, menopausa precoce, distúrbios alimentares e história materna de osteoporose (McCormick, 2007).

Neste âmbito, o risco de fratura absoluta é calculado através da utilização de algoritmos que incluem densidade mineral óssea (DMO), idade, sexo, história de fratura anterior e outros fatores de risco. O ênfase atual sobre estes algoritmos no diagnóstico e tratamento da osteoporose está relacionado com a importância da qualidade óssea. A DEXA é considerada o padrão de referência de avaliação da densidade mineral óssea. Porém, não oferece a resposta atempada e desejável para a monitoração da terapêutica. Os locais de medição incluem a coluna lombar, do cólon do fémur, e a trocânter maior do fémur. Assim, na prática clínica corrente, para realizar um diagnóstico de uma patologia óssea utiliza-se a medição da densidade óssea em conjunto com a determinação de fatores de risco (Genuis & Bouchard, 2012).

### 5.5.1. O Papel do RANK / RANKL / OPG e células T na remodelação óssea

A prevenção da fratura osteoporótica é uma prioridade de cariz essencialmente socioeconómico. Tal como a reabsorção óssea, é preciso aumentar a formação óssea para prevenir fraturas osteoporóticas, especialmente em pacientes idosos com baixa remodelação óssea (Suzuki et al., 2008).

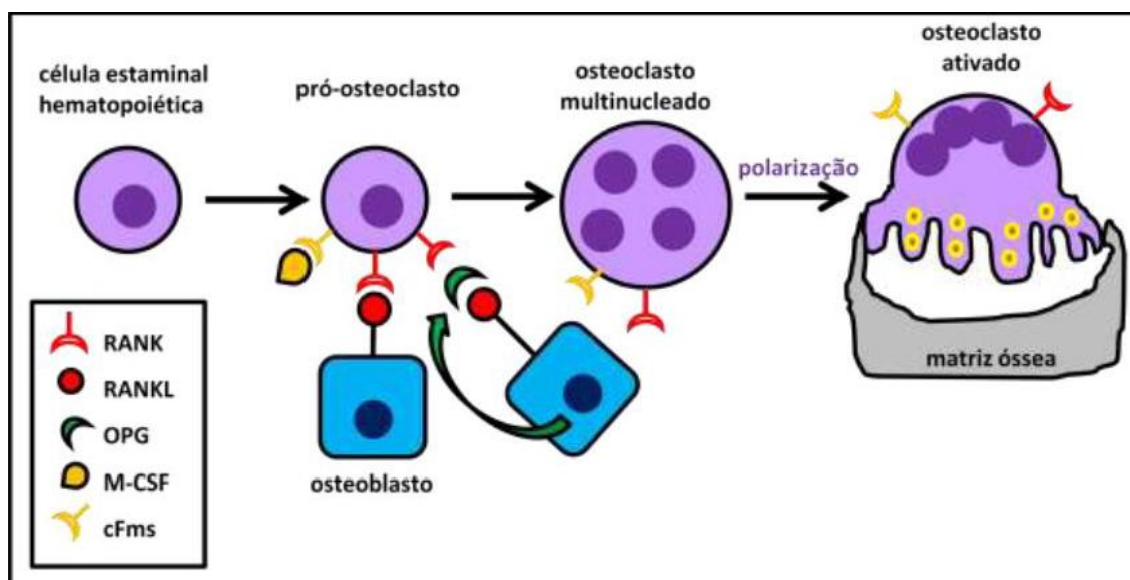


Figura 9: Esquema da osteoclastogénese e os seus principais moduladores, (De, 2007)

A saúde do osso, caracterizado pela sua massa, densidade e microarquitetura, é mantido por um sistema equilibrado de remodelação. A falta dessas qualidades, causada por um desacoplamento do processo de remodelação e conduz à fragilidade óssea e aumento do risco de fratura (De, 2007). O principal regulador de remodelação óssea é o sistema RANK/ RANKL/ OPG (figura 9). Este sistema osteo-imunológico, associado ao recetor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) localizado na superfície dos osteoclastos e pré-osteoclastos, determina o sucesso ou o fracasso da homeostase óssea. A origem comum do osso e das células estaminais imunológico é a chave para a compreensão deste sistema e a fisiologia da perda óssea. Os osteoclastos e células do sistema imunitário, têm a mesma origem: provêm na medula óssea a partir de células hematopoiéticas, responsáveis pela produção de células sanguíneas (figura 9). Os osteoclastos desenvolvem a partir de linhagens celulares precursoras monócitos-macrófagos mononucleares, após a estimulação de macrófagos por fator estimulante de colónias (M-CSF) e o recetor ativado para fator nuclear kappa B (RANKL).

Por outro lado, os osteoblastos derivam de células pluripotentes de origem mesenquimal e compartilham a mesma célula precursora comum com adipócitos. Durante a remodelação óssea normal, as células do estroma da medula e osteoblastos produzem RANKL e induz a diferenciação e ativação. Isso ocorre por meio do fator de transcrição, fator nuclear kappa B (NFκB), que é responsável não só para ativar a atividade osteoclástica, mas também pela resposta inflamatória do organismo. Tanto a diferenciação de osteoclastos e o processo inflamatório ocorre através da regulação da IL-6. Os osteoblastos inibem a IL-6 e produzem OPG, um recetor que bloqueia a RANKL e mantém o controlo do processo de remodelação óssea. OPG é vital para o sucesso do sistema de RANK / RANKL / OPG da homeostase óssea (McCormick, 2007). A reabsorção óssea é influenciada pelos osteoblastos através da interação entre RANK, RANKL e OPG. OPG e RANKL desempenham um papel crítico na regulação de remodelação óssea, agindo sobre a atividade dos osteoclastos. Podem eventualmente ser utilizados como marcadores do metabolismo ósseo, embora a função de sinalização do sistema imunitário do RANK pode limitar a sua especificidade para o osso (Terreni & Pezzati, 2012).

## **6. A Vitamina K no diagnóstico da osteoporose**

A importância da vitamina K como um alvo terapêutico na osteoporose é bem conhecida e tem sido amplamente reconhecida para o tratamento de pacientes com osteoporose. Com base nas diversas funções importantes da vitamina K no metabolismo ósseo, seu significado clínico como ferramenta de diagnóstico surgiu entre a prática clínica e entre pesquisadores nos últimos anos (figura 10). A importância da vitamina K como um biomarcador no diagnóstico da osteoporose ou como um novo marcador bioquímico alvo terapêutico na osteoporose é atualmente bem conhecida (Heiss et al., 2008).

A vitamina K representa um importante cofator enzimático para a modificação pós-tradução e ativação de várias proteínas envolvidas no metabolismo ósseo. Os doentes com osteoporose têm apresentado um défice de vitamina K. No entanto, só a vitamina K não é suficiente para indicar o estado mineral do osso. Para obter um correto

diagnóstico de patologias ósseas, em particular osteoporose, deve-se optar por utilização de vários marcadores bioquímicos combinados (figura 10) (Heiss et al., 2008).

Muitos estudos publicados até à data evidenciaram a existência de uma correlação significativa entre fratura e os índices de vitamina K. Tem sido sugerido, por conseguinte, que a deficiência de vitamina K subclínica contribui para o aumento da incidência de fraturas através de mecanismos dependentes e independentes de BMD dependente mecanismos (Kaneki et al., 2006). No entanto, no que diz respeito à sua relação a DMO, resultados foram controversos: em alguns estudos, a ingestão de filloquinona foi correlacionada com aumento de risco de fratura, mas não com a DMO, enquanto que, noutros estudos, o consumo de filloquinona foi significativamente associada com a DMO (Kaneki et al., 2006). Embora o seu efeito sobre a DMO pode ser bastante superficial, a vitamina K<sub>2</sub> pode ter o potencial para regular metabolismo ósseo e reduzir o risco de osteoporose fraturas. (Iwamoto et al., 2006).

Um estudo realizado para comparar a utilização de vitamina K e outros marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea evidenciou que a sensibilidade de vitamina K para um diagnóstico correto foi significativamente maior (16,7%) do que para outros biomarcadores de osso. Com uma sensibilidade de 64% e uma especificidade de 82%, a vitamina K atingiu o maior AUC<sup>5</sup>. Surpreendentemente, através da combinação de vitamina K e AP, BAP e PYD, AUC os valores foram ainda maiores (> 0,9), enquanto a combinação de parâmetros de vitamina K / PYD e vitamina K/BAP demonstrou uma sensibilidade de 75-88 % (Heiss et al., 2008).

Desde que a vitamina K está intimamente relacionado com marcadores ósseos bioquímicos, seu significado clínico e relevância têm aumentado. Durante os últimos 10-20 anos, estes índices de ossos foram usados principalmente para monitorar a resposta terapêutica em doenças ósseas. No entanto, a sua utilidade para o diagnóstico clínico de osso doenças, especialmente a osteoporose, permanece por esclarecer. Facilitada pelos resultados de novos índices bioquímicos do osso [por exemplo: NTX, sialoproteína óssea (BSP), e vitamina K], tem sido mostrado que osteoporose pode resultar em aumento dos níveis de NTX e ligações cruzadas DPD/PYD (figura 10). Assim, ainda existe uma necessidade urgente para alcançar um perfil de marcador

---

<sup>5</sup> AUC: Área Sob a Curva. Parâmetro cinético que funciona como marcador indireto de biodisponibilidade. É uma medida da quantidade de fármaco no organismo, que aumenta linearmente com a dose.



bioquímico apropriado para profilaxia e diagnóstico de doenças dos ossos, especialmente a osteoporose (Heiss et al., 2008).

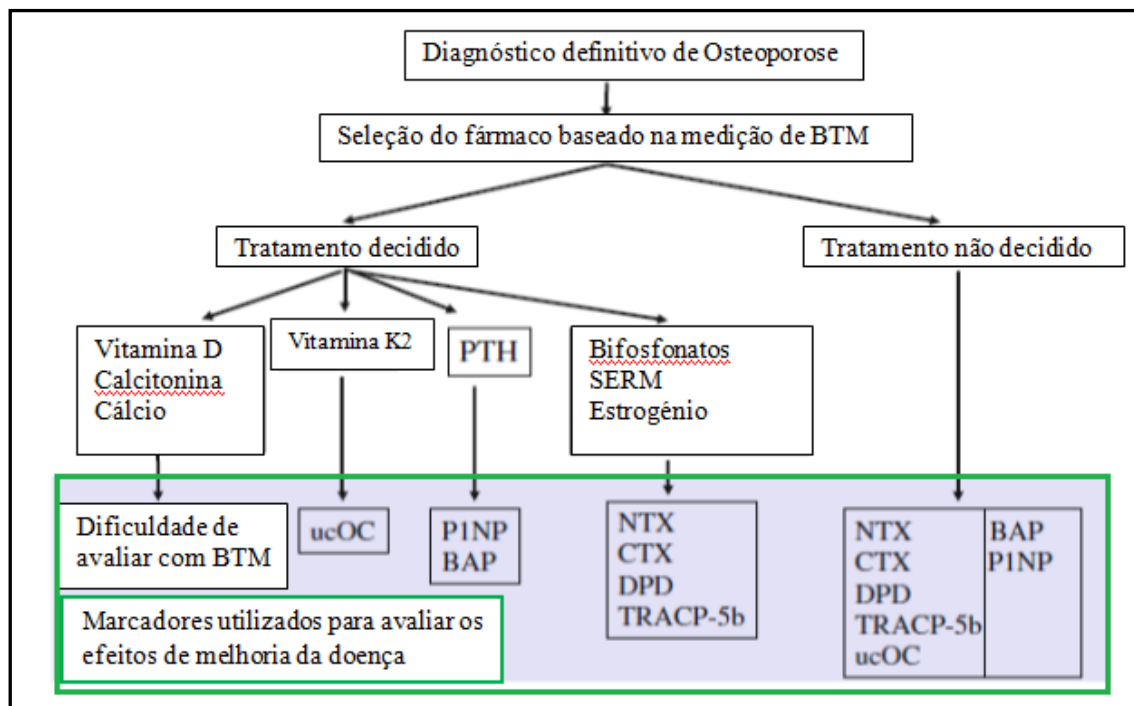


Figura 10: A utilização de Marcadores de turnover ósseo no diagnóstico da Osteoporose. (adaptado de Nishizawa et al., 2013)

### 6.1. Défice de micronutrientes e o metabolismo da vitamina K

A deficiência de vitamina K, a qual é caracterizada por um aumento do nível de ucOC em circulação e, conseqüentemente, redução da produção de osteocalcina  $\gamma$ -carboxilada, podem contribuir para o risco de fraturas osteoporóticas. Deste modo, a deficiência de vitamina K pode levar ao comprometimento da carboxilação da osteocalcina, (“Vitamin K Functions and Functional Markers,” 2008). Um estudo prospectivo mostrou que ucOC prevê o risco de fratura do fêmur independentemente da DMO do colo do fêmur em mulheres idosas. Subsequentemente, ucOC tem sido considerado como um fator de risco para fratura, independente da idade e da DMO (Yamauchi et al., 2010).

A elevada atividade de fosfatase alcalina intestinal, que se localiza nas microvilosidades do epitélio intestinal, sugere a participação deste enzima no transporte de nutrientes. Nos seres humanos e animais, uma alimentação rica em gordura contém

níveis séricos elevados da atividade de ALP intestinal. Esta descoberta sugere a possibilidade de que a ALP intestinal pode regular não só o metabolismo do fosfato, mas também o metabolismo lipídico (figura 11) (Sogabe et al., 2011).

Estudos utilizando estes marcadores verificaram que a suplementação de MK-4 não influenciou estes fatores de crescimento afetando o metabolismo ósseo. Um anterior estudo *in vitro* relatou que o MK-4 inibiu a formação de adipócitos em células de medula óssea. Tanto a filoquinona como a MK-4 têm efeitos sobre a redução da deposição lipídica dos tecidos, *in vivo*. As diferenças estruturais na cadeia lateral dos diferentes homólogos da vitamina K influenciam o seu metabolismo lipídico, incluindo na forma como ela é transportada, atinge os tecidos alvo, e subsequentemente é excretada (figura 11). No estado pós- prandial, a filoquinona é transportado principalmente por lipoproteínas e convertido em MK-4, acumulando-se posteriormente se nos tecidos extra-hepáticos. A deposição de gordura pode ser mediada não só por vitamina K proveniente da dieta, mas também por MK-4 que foi convertido de filoquinona. Como a vitamina K é lipossolúvel, uma má absorção de gordura pode originar uma deficiência da vitamina K (figura 11) (Iwamoto et al., 2006; Sogabe et al., 2011).

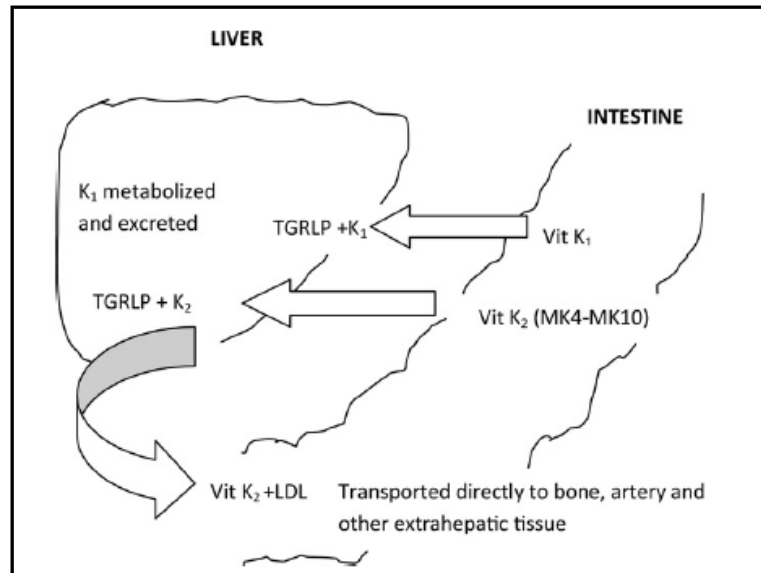


Figura 11: Co-transporte de triglicerídeos e Vitamina K, (Falcone, Kim, & Cortazzo, 2011)

## **6.2. O contributo da inflamação para o aumento do risco de fratura**

A evidência recente sugere que a inflamação pode contribuir para a doença de osteoporose. Entre as mulheres idosas, concentrações elevadas de marcadores inflamatórios, como a IL-6 e OPG foram associadas a um risco aumentado de fratura incidente. Associações entre a concentração de vitamina K e de várias citocinas pró-inflamatórias, mais especificamente, filoquinona plasmática foi inversamente associada à inflamação em geral, bem como com os biomarcadores individuais pró-inflamatórias, incluindo a IL-6 e TNF- $\alpha$ . Baixa concentração plasmática de filoquinona foi associada com altas concentrações séricas de marcadores inflamatórios (PCR e IL-6) e baixas concentrações de osteoprotegerina (Shea et al., 2009).

A OPG é uma citocina anti-inflamatória proveniente da família dos fatores de necrose tumoral, que protege contra a reabsorção óssea e é parcialmente regulada por IL-6, uma citocina pró-inflamatória. Uma elevada % ucOC foi associada a um baixo osteoprotegerina, o que é consistente com baixas concentração plasmática de filoquinona (K1). Estudos demonstram que o tratamento com vitamina K aumentou a produção de OPG em células da medula óssea, e, num pequeno estudo de pacientes que estão sendo tratados com medicação glicocorticóide para a doença renal, o tratamento com a vitamina K impediu uma redução de OPG sérica induzida por glucocorticóides. As associações entre as concentrações séricas de OPG e BMD são inconsistentes em homens e mulheres, devido à modulação da OPG exercida por hormonas sexuais. (Shea et al., 2009)

## **6.3. Importância das proteínas da matriz óssea na concentração da vitamina K**

A vitamina K tem um papel importante na síntese de proteínas ósseas ligadas ao cálcio (Suzuki et al., 2008). Existem três proteínas GLA constituintes da matriz óssea e VKD, importantes para a formação óssea: osteocalcina (OC), também denominado proteína Gla óssea), proteínas GLA da matriz (MGP), e proteína S. A protrombina e proteína S encontram-se no fígado e pâncreas, são substratos de GGCX e estão envolvidos na coagulação (Booth, 2009; Holzer et al., 2010).

### **6.3.1.1. Osteocalcina (OC)**

A osteocalcina foi descoberta em 1975 e é uma proteína VKD dependente contendo ácido gama-carboxiglutâmico e que sofre  $\gamma$ -carboxilação. É não colagenosa e a proteína mais abundante da constituição óssea (Kaneki et al., 2006; Tasci et al., 2011). Esta proteína está envolvida na absorção do cálcio e a mineralização óssea. A  $\gamma$ -carboxilação é, em grande parte, responsável pelas suas propriedades de ligação ao ião cálcio, que é conhecido por mediar a forte ligação da OC à hidroxiapatite (“Vitamin K Functions and Functional Markers,” 2008).

A OC sérica está associada a remodelação óssea um fator determinante da osteoporose. Quando a OC é sintetizada tendo como precursor os osteoblastos, e a vitamina K está disponível em quantidades suficientes no osso, a OC é completamente  $\gamma$ -carboxilada e incorporada na matriz óssea (Yamauchi et al., 2010).

A OC é sintetizada apenas em osteoblastos maduros durante a formação óssea e também é libertada no sangue, sendo utilizada como marcador de formação óssea (Booth, 2009; Holzer et al., 2010; McCormick, 2007). A OC contém hidroxiprolina, razão pela qual a sua síntese depende, não só da vitamina K, como também da vitamina C (Holzer et al., 2010).

A nível fisiológico, a produção de OC é induzida pelos osteoblastos, calcitriol e vitamina K, e é responsável para a ativação de carboxilação de OC, necessário para a ligação ao cristal de hidroxiapatite (McCormick, 2007). No entanto, quando a OC não sofre completa  $\gamma$ - carboxilação, designa-se de ucOC, que não é incorporada matriz óssea, mas é libertada para circulação sanguínea. Assim, quando a remodelação óssea é acelerada, o precursor da OC (osteoblastos) é excessivamente sintetizado, o que provoca um aumento dos níveis ucOC (Yamauchi et al., 2010). Quando a concentração da vitamina K é baixa, a percentagem de osteocalcina descarboxilada (% ucOC) aumenta (figura 12). Como a OC é não carboxilada, não pode vincular a hidroxiapatite, os seus níveis séricos (ucOC) é um bom marcador bioquímico do turnover metabólico no osso (Plaza & Lamson, 2005) e fornece ainda um índice sérico da vitamina D. No entanto, a medição de OC total, tanto totalmente carboxilada como descarboxilada, não é uma medida fidedigna da real concentração da vitamina K. Em vez disso, é uma medida da formação do osso e regulador da maturação óssea (Booth, 2009; Shea et al., 2009).

Assim, a razão ucOC / OC (COC) são indicadores sensíveis para o estado da vitamina K. Estudos indicam que baixas concentrações séricas de COC ou valores elevados de ucOC são fatores de risco para fratura do colo femoral (“Vitamin K Functions and Functional Markers,” 2008). A % ucOC no soro permite a avaliação de OC total e ucOC sérico, em conjunto. Assim, circula OC descarboxilada (ucOC) que é uma medida extremamente sensível para determinação do estado de vitamina K que está incluído nos testes de coagulação de sangue convencionais (Kaneki et al., 2006). A % ucOC é um marcador sensível para a vitamina K que pode estar associado a outros marcadores bioquímicos ósseos (Yamauchi et al., 2010). É um indicador útil para a orientação sobre a ingestão de vitamina K no exame de diagnóstico da osteoporose (Yamauchi et al., 2010). Mudanças de OC total ocorrem geralmente devido a alterações da ucOC. Assim ucOC é um marcador primário em circulação, em que ele pode ser medido para identificar o estado da vitamina K (“Vitamin K Functions and Functional Markers,” 2008). Portanto, o nível sérico de ucOC é um marcador sensível para a deficiência de vitamina K no osso. Embora o mecanismo exato ainda é desconhecido, muitos relatórios indicaram que ucOC é um preditor independente para fratura osteoporótica (Nishizawa et al., 2013). Estudos demonstram que a vitamina K2 aumenta a  $\gamma$ -carboxilação de osteocalcina.

A ucOC% varia de acordo a ingestão diária de vitamina e suplementação K, e uma elevada % ucOC é considerado um indicador sensível do déficit da vitamina K no osso. A relação da eficácia da suplementação de vitamina K para a redução da perda óssea está relacionada com a idade. Em adultos saudáveis, uma fração muito pequena de fatores de coagulação do sangue é descarboxilada, bem como uma parte substancial da circulação OC. (Kaneki et al., 2006). Numa análise prospectiva, elevada % ucOC, que ocorre quando os níveis séricos da vitamina K se encontram baixos, é um marcador de risco aumentado para fratura do colo do fêmur em idosos e a perda de densidade mineral óssea (BMD) (figura 12) (Azuma et al., 2013; McCormick, 2007). Evidências epidemiológicas sugerem que a deficiência subclínica de vitamina K está associada à perda de massa óssea relacionada com a idade e ao aumento de incidência de fraturas osteoporóticas (Kaneki et al., 2006). Assim, pode-se concluir que a vitamina k é, indiretamente, um bom marcador de diagnóstico relacionado com a concentração de osteocalcina.

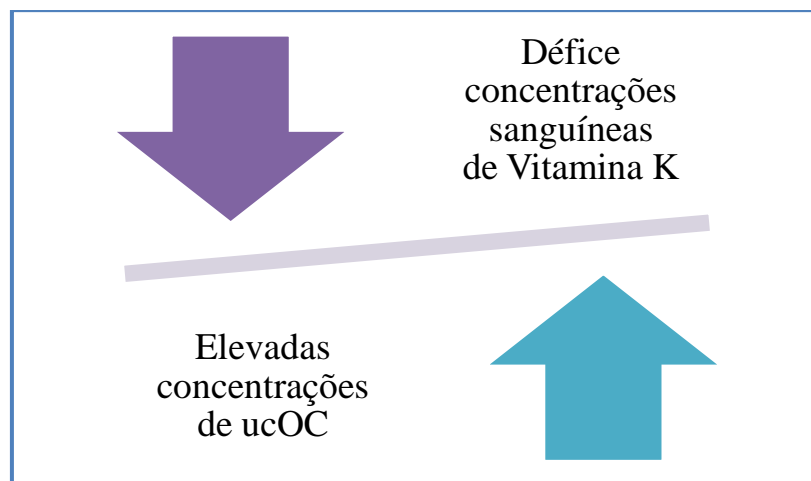


Figura 12: Relação da ucOC com Vitamina K

O déficit de vitamina K leva ao aumento da concentração de OC descarboxilada (figura 12). Este aumento também pode estar associado à utilização de anticoagulantes orais que são antagonistas da vitamina K. Uma série de relatórios têm correlacionado uma diminuição óssea densidade mineral e aumento de taxas de fratura cinco a oito vezes mais com aumento em osteocalcina descarboxilada (ucOC) (Kaneki et al., 2006).

UcOC encontra-se em elevada concentração no sangue e na urina e, por isso, pode ser medido por técnicas laboratoriais. Uma baixa concentração da vitamina K está associada a uma baixa DMO e aumento do risco de fraturas em adultos com osteoporose. Até agora, a medição da amostra de soro em ucOC foi realizada por uma combinação de imunoensaio, por meio de um anticorpo monoclonal específico para osteocalcina descarboxilada. Ao efetuar uma medição de ucOC recorrendo a anticorpos monoclonais específicos, verificou-se que esta não se liga a hidroxapatite. Esta medição fornece informação clínica útil do metabolismo ósseo, e, assim, da concentração da vitamina K em circulação sanguínea (“Vitamin K Functions and Functional Markers,” 2008).

#### **6.3.1.2. PIVAKA-II- Protrombina descarboxilada**

Um déficit de vitamina K leva a um aumento dos níveis plasmáticos de formas biologicamente inativas, sub-  $\gamma$ - carboxilados de fatores de coagulação. Estas proteínas são referidas como proteína induzida pela ausência da vitamina K (PIVKA). Em referência à protrombina, também chamado de fator II, o termo usado é PIVKA – II. A medição do tempo de protrombina no plasma revela a ativação dependente da vitamina K e da protrombina outros fatores de coagulação. Um tempo de Protrombina maior do

que 12 segundos pode indicar deficiência de vitamina K, apesar de não ser um indicador sensível da concentração da vitamina K, pois não é uma indicação suficiente de que a atividade da vitamina K está presente para manter a atividade da OC do osso. Embora o tempo de protrombina (PT) seja um teste para a deficiência em vitamina K -dependente de fatores de coagulação, não é um biomarcador sensível para a deficiência ligeira de vitamina K (Plaza & Lamson, 2005).

#### **6.3.1.3. MGP**

MGP é uma proteína dependente da vitamina K, tal com a OC. É sintetizado em diferentes tecidos, tais como pulmão, coração, rim, cartilagem e osso (“Vitamin K Functions and Functional Markers,” 2008).

Apesar do papel para a vitamina K na regulação de calcificação vascular ter sido proposto há cerca de 30 anos, a evidência em seres humanos até à data tem sido limitada. A proteína GLA da matriz óssea, MGP, não é só proteína de matriz óssea. É também uma proteína que inibe a calcificação dos condrócitos. A deficiência de vitamina K pode reduzir MGP e levar ao excesso de calcificação de tecidos moles (McCormick, 2007). MGP é uma VKDP, e, como tal, devem ser  $\gamma$ -carboxilado para se tornar funcional. A maioria dos Ensaios atualmente disponíveis para medir MGP sérico total não discrimina entre o MGP descarboxilada e formas carboxilados de MGP, o que dificulta a interpretação destes resultados. Assim, a medição de MGP torna-se ambígua no diagnóstico de patologias ósseas, como a osteoporose (Booth, 2009). As células musculares lisas vasculares, que têm um papel essencial na calcificação, sintetizam o MGP. Porém, o MGP inibe a calcificação vascular através de uma variedade de mecanismos, incluindo a ligação de íons de cálcio e cristais, e matriz extracelular. Tem sido demonstrado que a regulação da atividade do de cálcio por parte da MGP depende sobretudo da  $\gamma$ -carboxilação de resíduos de GLU específico que conferem uma alteração conformacional à MGP (Booth, 2009).

#### **6.4. Suplementação de Vitamina K**

A suplementação torna-se ainda mais importante para aqueles com uma tendência à má absorção de lípidos, dado que a vitamina k é lipossolúvel (Plaza & Lamson, 2005). Em estudos de administração de vitamina K em mulheres na pós-

menopausa com osteoporose, foi demonstrado que a suplementação de vitamina K aumenta a DMO, previne a perda óssea e reduz a incidência de fraturas (Heiss et al., 2008). Uma adequada ingestão de cálcio, vitamina D e proteína leva à redução da remodelação óssea, à maior retenção de cálcio, à redução da perda óssea relacionada à idade e, conseqüentemente, à redução do risco de fraturas. Evidências recentes indicam que uma alimentação saudável, incluindo a ingestão de produtos lácteos, frutas e legumes, e uma quantidade adequada de carnes, peixes e aves, está relacionada positivamente com a saúde óssea. Além disso, a suplementação de vitaminas e minerais deve ser monitorada de perto, por profissionais de saúde, uma vez que pode ter efeitos adversos e ser insuficiente para assegurar uma eficaz proteção à saúde óssea (Peters & Martini, 2010).

A suplementação da vitamina K também tem demonstrado que diminui o nível de circulação ucOC, bem como melhorar a remodelação óssea. A influência da vitamina K para a função do osso é, provavelmente, muito mais elevada do que aquelas necessárias para manter a homeostase normal (Holzer et al., 2010). O fato de que a sub-carboxilação de proteínas GLA é comum na população em geral que sugere aumento da ingestão de vitamina K pode ser um fator importante na melhoria da saúde pública. Os seguintes grupos merecem especial atenção:

➤ **Crianças**

A osteocalcina é uma das mais abundantes proteínas no corpo humano, e durante o seu crescimento a sua síntese é, pelo menos, 10 vezes maior. Isto significa que as necessidades de vitamina K nas crianças são muito maiores do que em adultos. Porém, o aumento consumo de fast-food e lanches que resultou em diminuir o consumo de vitamina K por crianças ano após ano. Vários estudos têm demonstrado que o aporte da vitamina K de crianças durante o crescimento é extremamente pobre (Vermeer, 2012).

➤ **Grávidas**

A vitamina K, como é lipossolúvel não é transportada através da placenta. No entanto, o crescimento fetal está em necessidade de vitamina K que é extraído do sangue da mãe. Demonstrou-se que, especialmente durante o último trimestre da gestação a concentração da vitamina K diminui, e que, quando suplementada, resulta em melhoria de carboxilação da OC tanto nas mães e recém-nascidos. A concentração da vitamina K no recém-nascido é extremamente baixa, o que é a razão por isso que a



suplementação de vitamina K, imediatamente após o nascimento é obrigatória na maioria dos países em todo o mundo. Doença hemorrágica do recém-nascido (HDN) é uma complicação grave em bebês sem suplementação de vitamina K durante todo o período de amamentação. É de notar que o Homem é o único mamífero que o leite materno apresenta baixa concentração de vitamina K. Assim, a criança necessita de suplementação para evitar risco de vida (Vermeer, 2012).

### ➤ **Idosos**

Tem sido relatado que a OC carboxilada (como um marcador geral de vitamina K) diminui a sua concentração após os 50 anos. Isto pode ser relacionado com a menor ingestão de alimentos, diminuiu absorção intestinal, ou uma maior exigência. Infelizmente, esta situação coincide com o início da idade relacionada com fenómenos como aumento da taxa de perda óssea e calcificação vascular. É claro que esses processos são multifatoriais, mas o acumular de fatores de risco potencia o risco de perda óssea (Vermeer, 2012).

O excesso de ingestão de vitamina K não pode resultar em mais carboxilação de fatores de coagulação. Além disso, o excesso de consumo de vitamina K irá interferir com a eventual terapêutica concomitante do doente, principalmente com anticoagulantes orais, como varfarina e acenocumarol, e o seu destes anticoagulantes a longo prazo provoca perda acelerada da massa óssea (Vermeer, 2012).

No Japão, a suplementação de MK-4 em doses de 45 mg/ i.d é utilizada como um tratamento farmacológico para a osteoporose, devido à eficácia terapêutica comprovada de MK-4. Estas doses não podem ser obtidas a partir da dieta, independentemente da forma de vitamina K consumido. Estudos sugerem que, antes da suplementação com MK-4, pode utilizar-se primeiro de 5 mg de filoquinona, para prevenção de fraturas (Booth, 2009). Em resposta a suplementação de MK-4 desenvolve-se melhor remodelação óssea, que é medida pela circulação dos marcadores de formação óssea e reabsorção óssea. Estudos efetuados concluíram que a suplementação com MK-4 por mais do que seis meses reduz risco de fratura do fémur e fratura vertebral. Porém, existem estudos que se opõem ao anteriormente referido, pois relatam que não existe nenhum efeito protetor da DMO da anca com 45 mg /i.d de MK-4 (Booth, 2009). Embora as doses provenientes da dieta têm tendências favoráveis sobre o estado do osso, a dose farmacológica de vitamina K2 foi muito mais eficaz em termos de prevenção, perda óssea e o risco de fratura (McCormick, 2007).

## **6.5. A influência dos BTM nas patologias ósseas**

Os BTM têm interesse para a prática clínica, pois são fáceis de medir, o custo de uma única medição é baixo e a sua resposta ao tratamento é rápida em comparação com a DMO. Deste modo, os marcadores bioquímicos são considerados um instrumento útil, não-invasivo para o acompanhamento clínico de pacientes com osteoporose, pois eles podem fornecer uma visão dinâmica do processo de remodelação e dar informações sobre a atividade metabólica de tecido ósseo ou sobre a patogênese da perda óssea (Baldini et al., 2013). No entanto, a sua principal desvantagem é a grande variabilidade intrapessoal. Esta variabilidade depende tanto sobre a variabilidade analítica e de vários fatores de variabilidade pré-analítica que pode ou não pode ser modificada. As medições BTM ajudam a excluir patologias ósseas caracterizadas por alta rotatividade de osso, por exemplo, doença de Paget, osteomalacia, hiperparatireoidismo primário, hipertireoidismo, metástases ósseas e mieloma múltiplo (Szulc, 2012).

### **6.5.1. Interpretação dos BTM**

O tratamento da osteoporose induz alterações grandes e rápidas na concentração de BTM. A avaliação inicial com medidas repetidas em pontos definidos durante a terapia é obrigatória. Vários estudos têm mostrado que alguns marcadores de reabsorção óssea são preditores independentes de fraturas, principalmente na coluna e fêmur. Verificou-se ainda uma associação entre o aumento dos valores dos marcadores de formação óssea e o risco de fratura (Bergmann et al., 2009; Lee & Vasikaran, 2012). Enquanto BTM predizem o risco de fratura de forma independente de BMD, as suas relações estabelecidas entre outros fatores de risco incluídos no cálculo de risco está por ser esclarecida (Lee & Vasikaran, 2012). Uma fratura origina um aumento dos valores de BTM, que se torna evidente até 6 meses após o evento. Os marcadores de formação óssea podem permanecer elevada mesmo em 52 semanas, enquanto marcadores de reabsorção geralmente retornam rapidamente ao seu valor basal (Lee & Vasikaran, 2012).

Portanto, antes de tratamento de pacientes com um diagnóstico de osteoporose definitivo, o estado do metabolismo ósseo podem ser mais claramente determinada por medição simultânea de marcadores de formação e também de reabsorção óssea. Quando valores de BTM são elevados (superiores a valores de referência estratificadas por sexo e menopausa), tumores ósseos metastáticos, outros distúrbios do metabolismo ósseo, e no metabolismo de cálcio anormalidades podem estar presentes, que garante ainda mais exames (Nishizawa et al., 2013). Um aumento na remodelação óssea sistêmica refletida por elevados valores de marcação metabólica óssea está associado a uma futura perda óssea independente da massa óssea e outros fatores de risco associados à osteoporose (Nishizawa et al., 2013). Os valores de marcadores de formação óssea acima do limite superior do intervalo de referência, e os valores de osso marcadores de reabsorção acima da média, em mulheres saudáveis na pré-menopausa, indicam um elevado risco de perda óssea no futuro (Nishizawa et al., 2013).

Os marcadores bioquímicos de remodelação óssea não só variam as suas concentrações durante o dia, mas, na maioria dos casos, também entre os dias consecutivos. Este fenómeno é designado variabilidade dia-a-dia e é aparentemente devido às variações dos níveis reais de marcadores. Em geral, os marcadores séricos mostram menos variabilidade dia-a-dia de marcadores de remodelação óssea, em relação aos medidos na urina. A variação do dia-a-dia da excreção urinária de PYD e DPD, medida por HPLC, e corrigida com a creatinina, que varia entre 16-26% (Seibel, 2005). Os marcadores de turnover ósseo apresentam uma variabilidade, o que dificulta a sua utilização na prática clínica: sempre que uma alteração de um marcador ósseo seja observada em um doente (por exemplo, na sequência de um intervenção cirúrgica), essa mudança deve ser interpretada de acordo com variabilidade do respetivo marcador. Estudos demonstram que a remodelação óssea e a sua regulação variam de acordo com mudanças sazonais decorridas ao longo do ano. Mais recentemente, mudanças sazonais também foram descritas para os marcadores do metabolismo ósseo, com um 20-30% menor taxa de rotatividade no verão do que no inverno. O aumento de turnover ósseo no Inverno pode ser devido, pelo menos em parte, à deficiência de vitamina D (Seibel, 2005). Marcadores de reabsorção óssea (urinária CTX-I e de NTX-I) diminuem em 60-70% no dia após a administração da primeira dose e os marcadores de formação óssea diminuiu em 20-30% após um mês de tratamento (McCormick, 2007).

O uso de marcadores turnover ósseo na monitorização do tratamento da osteoporose é bem reconhecido. A importância de medir marcadores metabólicos ósseos

foi originalmente considerado como um marcador substituto para a BMD, mas agora sua importância como um meio para avaliar a qualidade óssea e para avaliar o risco futuro de ocorrência de fratura é considerada na prática clínica. As medições de BMD e marcadores do metabolismo ósseo na gestão da osteoporose (cada uma relacionada com a força do osso) permitem observar os dois mecanismos diferentes de osso: formação e reabsorção óssea. Por outro lado, o fenômeno de uma discrepância entre mudanças BTM e BMD do osso com o tratamento medicamentoso é característico do quadro clínico da osteoporose (Nishizawa et al., 2013). Portanto, é necessário um marcador substituto necessária para confirmar a eficácia do tratamento. As alterações na DMO e BTM após o início do tratamento da osteoporose independente correlacionam-se com a redução do risco de fratura. No entanto, o DEXA é amplamente utilizado devido à sua redução dos custos e da baixa dose de radiação, maior precisão, menor tempo de aquisição de imagem (figura 13) (Nishizawa et al., 2013).

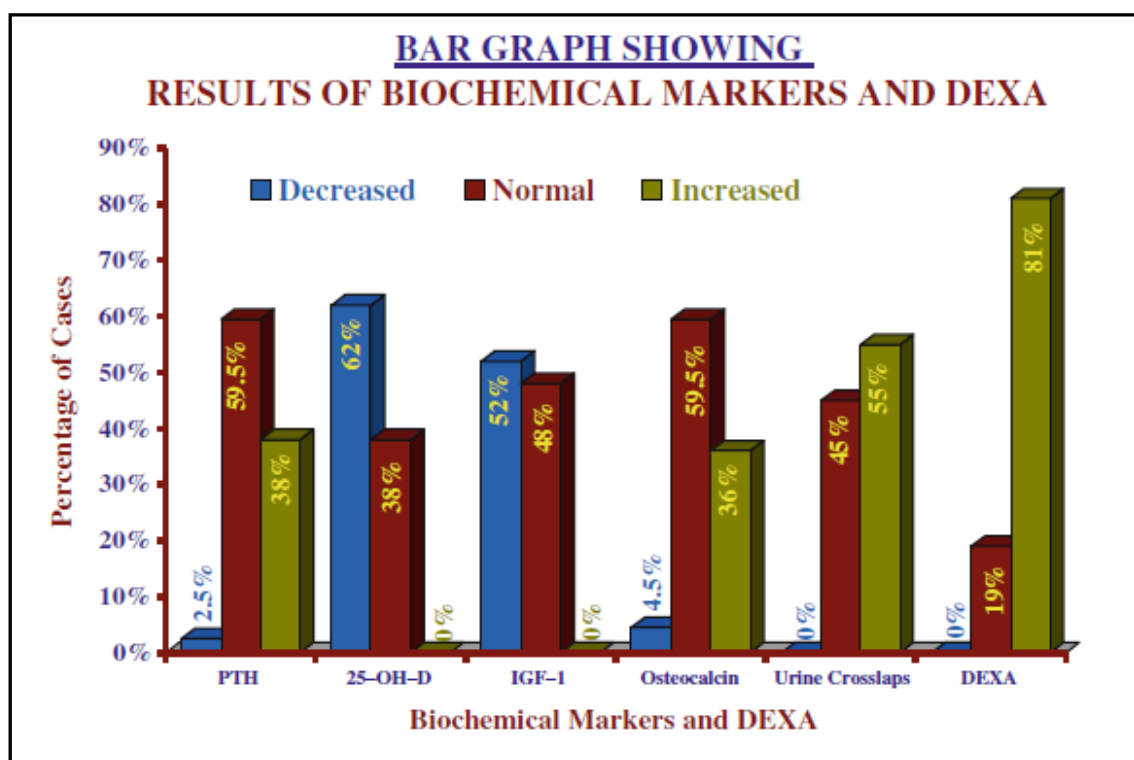


Figura 13: Comparação entre diferentes marcadores bioquímicos e DEXA, (Merchant et al., 2010)

Apesar de a correlação entre DMO e BTM ser estatisticamente significativa, BTM não podem ser utilizados como marcadores de previsão da DMO (Figura 13).

Ambos são preditores independentes de risco de fratura, mas pode BTM ser usado apenas como um fator de risco adicional na escolha do tratamento. Os dados recentes não suportam o uso de BTM para selecionar o melhor tratamento mas sim monitorizar a eficácia do tratamento antes das alterações da DMO pode ser avaliada (figura 13). Alterações precoces na BTM podem ser usado para medir a eficácia clínica de tratamento contra a osteoporose e para reforçar a adesão do paciente à terapêutica. Assim, enquanto DEXA determina a indicação para o tratamento de osteoporose, BTM reflete a eficácia do tratamento e podem ser usadas para motivar os pacientes a persistir com a sua medicação (Bergmann et al., 2009)

### **6.5.2. Limitações da utilização dos BTM**

A produção de BTM depende não só a taxa de turnover do osso, mas também do tipo e tamanho do osso, o que reflete principalmente remodelação óssea trabecular, que é 4 a 5 vezes mais ativa do que o osso cortical. Para marcadores de urina, a expressão como uma relação de creatinina apresenta outro fator de variabilidade. A relação entre a concentração medida e o que acontece no osso difere a nível intra-e inter-individual. (Bergmann et al., 2009). Vários fatores, tais como idade e sexo e a atividade física, podem aumentar o metabolismo ósseo.

Por outro lado, a ausência de padronização uniforme é ainda uma preocupação e torna difícil comparar os valores obtidos por diferentes métodos em laboratórios diferentes, razão pela qual todas as medições para um indivíduo deve ser feita no mesmo laboratório. (Bergmann et al., 2009). De acordo com o “Consenso do Belga Bone Club” (Bergmann et al., 2009), a monitorização dos BTM de cada paciente deve ser feito sempre no mesmo laboratório para evitar discrepâncias dos valores obtidos. Os laboratórios devem garantir que a variabilidade analítica está bem documentada e sob controlo para minimizar a contribuir para marcador LSC (Terreni & Pezzati, 2012) Assim, a principal fonte de variabilidade é pré-analítico, principalmente a conservação de amostras e variabilidade biológica.

O uso de BTM tem ainda outras limitações: corticoterapia a longo prazo, mobilidade reduzida, metástases ósseas, acromegalia e tireotoxicose pode mudar remodelação óssea. Em particular, o uso de corticosteroides superior a 3 meses, a inibir a formação de osso com uma queda em osteocalcina, PINP e ALP e aumenta a reabsorção óssea. O tempo desempenha um papel importante, quando o metabolismo

ósseo está em causa: os marcadores de formação óssea e reabsorção aumentam tão cedo como um mínimo de 4 meses após a fratura, refletindo a consolidação óssea. Atualmente, o uso da BTM funciona como uma ferramenta potencial para avaliar a fratura risco e para monitorar o tratamento (Terreni & Pezzati, 2012).

Embora a remodelação óssea nas mulheres pós-menopausa é maior do que nas mulheres com pré-menopausa, a variação circadiana é semelhante tanto para pré-e mulheres na pós-menopausa e, assim, não é influenciada por hormonas sexuais. A etiologia da variação diurna é desconhecida. Várias hormonas, como a PTH, a hormona do crescimento, cortisol ou mostram variações diurnas e podem, pois, ser envolvidos na geração de mudanças diurnas no metabolismo do osso (Seibel, 2005).

Os resultados da determinação de BTM devem ser interpretados com precaução em pacientes com fatores determinantes da variabilidade pré-analítica, por exemplo pacientes que sofreram uma fratura antes do exame. Outra limitação da utilização prática da BTM é a falta de padronização, falta de regras de controlo de qualidade, bem como dados limitados sobre valores de referência para BTM. É importante estabelecer valores de referência para cada ensaio de cada BTM em todas as faixas etárias em todos os países, pois, atualmente, os resultados para medições de BTM variam entre os laboratórios, mesmo para o mesmo ensaio disponível comercialmente e não podem ser comparadas os resultados (Szulc, 2012).

Recentemente, estudos evidenciaram que existe uma correlação entre os marcadores de formação e reabsorção óssea, nomeadamente PINP e CTX, em pacientes com Anemia Talassémica Major. O mecanismo subjacente é um desequilíbrio da remodelação óssea, com aumento da reabsorção. Um aumento da concentração sérica dos marcadores de reabsorção óssea e uma redução na deposição de marcadores ósseos têm sido atribuídos a sobrecarga ou "intoxicação" de ferro dos osteoblastos e têm sido descritos como as causas importantes da perda óssea em doentes com Talassémica Major (TM). Osteopatia representa uma causa importante de morbidade em pacientes com beta- talassemia major e se manifesta como osteopenia / osteoporose. O aumento da perda de massa óssea e subsequente remodelação é uma característica da osteopatia. Mais estudos sobre este tema são esperados com grande interesse, como eles vão ajudar no processo de escolha terapêutica (Baldini et al., 2013). Estes estudos permitem assim verificar que o aumento de marcadores de reabsorção pode não estar diretamente relacionado com osteoporose ou outras patologias, pelo que a sua simples leitura para o diagnóstico pode originar um viés, originando assim um diagnóstico erróneo.

## 7. Conclusão

A osteoporose é atualmente um grave problema de saúde pública, com elevados custos socioeconómicos. É importante atuar sobre este problema atempadamente, recorrendo a ferramentas de diagnóstico eficientes. Para escolher os marcadores de diagnóstico mais adequados deve-se ter em consideração, não só a evolução da patologia no utente, como também a sua etnia, sexo, idade, bem como outros fatores secundários (fraturas ocorridas no passado, predisposição genética, história familiar, sedentarismo, tabagismo) (Tavares et al., 2007).

A vitamina K, hoje em dia, é considerada uma promissora ferramenta de diagnóstico e tratamento da osteoporose. Em países asiáticos, como o Japão, MK-4, uma isoforma da vitamina K, já é utilizada com sucesso no tratamento da osteoporose (McCormick, 2007). Neste âmbito, foi demonstrado que a baixa concentração de vitamina K, nomeadamente a MK-4, está associada ao aumento do risco de desenvolver osteoporose. Porém, a vitamina K, quando isolado, não é considerado um marcador direto de diagnóstico da doença mas, quando correlacionado com a osteocalcina (ucOC), é um biomarcador sensível da determinação de osteoporose. A deficiência de vitamina K, que é caracterizada por um aumento nível de ucOC em circulação sanguínea e, conseqüentemente, redução da produção de OC  $\gamma$ -carboxilada, podem contribuir para o risco de fraturas osteoporóticas. Deste modo, a deficiência de vitamina K pode levar ao comprometimento da carboxilação total da OC, (“Vitamin K Functions and Functional Markers,” 2008). Existem ainda outros biomarcadores do metabolismo ósseo que podem determinar o diagnóstico da osteoporose. Estes podem ser de formação ou reabsorção óssea, associados ao aumento da atividade osteoblástica e osteoclástica, respetivamente.

A consequência mais grave da osteoporose será a fratura óssea. Assim, a principal preocupação no diagnóstico de osteoporose é a prevenção das fraturas osteoporóticas. Caso o doente já tenha sofrido uma fratura, o mais importante é fazer com esta primeira fratura seja a última na vida do doente. Alterações nos BTM pode ser útil para monitorar o tratamento da osteoporose e para confirmar o cumprimento terapias orais por parte do doente, e de eficácia do tratamento (Lee & Vasikaran, 2012).

Os biomarcadores permitem a detecção de alterações metabólicas muito antes de alterações na DMO, ressaltando a necessidade de recentrar a atenção de confiança unicamente em testes de BMD, como o DEXA. Uma abordagem abrangente permite utilizar biomarcadores para avaliar os riscos e identificar os mecanismos subjacentes da doença incluindo a inflamação, stress oxidativo, desequilíbrios hormonais, as deficiências nutricionais, e a má absorção. Uma vez que os fatores de risco foram identificados, num plano abrangente e individualizado, incluindo a dieta, exercício e nutrientes específicos, pode criar um ambiente metabólico favorável à remodelação óssea equilibrada e saudável (Mccormick, 2007).

Em última análise, o marcador aminoterminal do própeptido tipo I (P1NP) é um marcador recente, considerado o mais sensível e específico na detecção da formação óssea, relacionado com a síntese de colagénio pelos osteoblastos. Assim P1NP reflete ainda, com grande precisão, mudanças na síntese de um novo colagénio.

Por outro lado, a fiabilidade da fosfatase alcalina óssea é prejudicada pela reatividade cruzada entre as isoformas do osso e do fígado. No entanto, a degradação rápida de OC no soro e a incorporação na matriz óssea levar à degradação do péptido nativo em fragmentos heterogéneos, que pode ser detetada através de kits comerciais, mesmo com especificidade mal definidas e reatividade cruzada (Baldini et al., 2013).

Em suma, existe um crescente interesse em parâmetros bioquímicos do metabolismo ósseo para o diagnóstico da osteoporose. Eles podem, ser uma ferramenta adicional para o diagnóstico de patologias ósseas a curto prazo. A combinação de vitamina K a esses marcadores de diagnóstico é útil para o diagnóstico da osteoporose, bem como para avaliar a perda de massa óssea e risco de futuras fraturas ósseas (Heiss et al., 2008).



## Bibliografia

- Azuma, K., Ouchi, Y., & Inoue, S. (2013). Vitamin K : Novel molecular mechanisms of action and its roles in osteoporosis, 1–7. doi:10.1111/ggi.12060
- Baldini, M., Forti, S., Orsatti, a, Marcon, a, Ulivieri, F. M., Airaghi, L., Zanaboni, L., et al. (2013). Thalassemic osteopathy: A new marker of bone deposition. *Blood cells, molecules & diseases*, 8–11. doi:10.1016/j.bcnd.2013.09.008
- Bergmann, P., Body, J.-J., Boonen, S., Boutsen, Y., Devogelaer, J.-P., Goemaere, S., Kaufman, J.-M., et al. (2009). Evidence-based guidelines for the use of biochemical markers of bone turnover in the selection and monitoring of bisphosphonate treatment in osteoporosis: a consensus document of the Belgian Bone Club. *International journal of clinical practice*, 63(1), 19–26. doi:10.1111/j.1742-1241.2008.01911.x
- Booth, S. L. (2009). Roles for vitamin K beyond coagulation. *Annual review of nutrition*, 29, 89–110. doi:10.1146/annurev-nutr-080508-141217
- Cianferotti, L., & Brandi, M. L. (2012). Guidance for the diagnosis, prevention and therapy of osteoporosis in Italy. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*, 9(3), 170–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3535998&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- De, E. (2007). Impacto dos nutrientes na saúde óssea : novas tendências Nutrients impact on bone health : new trends, (81), 189–194.
- Genuis, S. J., & Bouchard, T. P. (2012). Combination of Micronutrients for Bone (COMB) Study: bone density after micronutrient intervention. *Journal of environmental and public health*, 2012, 354151. doi:10.1155/2012/354151
- Godfrey, J. R., & Rosen, C. J. (2008). Toward optimal health: advances in diagnosis and preventive strategies to promote bone health in women. *Journal of women's health* (2002), 17(9), 1425–30. doi:10.1089/jwh.2008.1143
- Hadji, P., Klein, S., Gothe, H., Häussler, B., Kless, T., Schmidt, T., Steinle, T., et al. (2013). The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Deutsches Ärzteblatt international*, 110(4), 52–7. doi:10.3238/arztebl.2013.0052
- Heiss, C., Hoesel, L. M., Wehr, U., Wenisch, S., Drosse, I., Alt, V., Meyer, C., et al. (2008). Diagnosis of osteoporosis with vitamin k as a new biochemical marker. *Vitamins and hormones*, 78(07), 417–34. doi:10.1016/S0083-6729(07)00017-9
- Holzer, G., Grasse, A. V., Zehetmayer, S., Bencur, P., Bieglmayer, C., & Mannhalter, C. (2010). Vitamin K epoxide reductase (VKORC1) gene mutations in

- osteoporosis: A pilot study. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 156(1), 37–44. doi:10.1016/j.trsl.2010.05.005
- Igarashi, M., Yogiashi, Y., Mihara, M., Takada, I., Kitagawa, H., & Kato, S. (2007a). Vitamin K induces osteoblast differentiation through pregnane X receptor-mediated transcriptional control of the *Msx2* gene. *Molecular and cellular biology*, 27(22), 7947–54. doi:10.1128/MCB.00813-07
- Igarashi, M., Yogiashi, Y., Mihara, M., Takada, I., Kitagawa, H., & Kato, S. (2007b). Vitamin K induces osteoblast differentiation through pregnane X receptor-mediated transcriptional control of the *Msx2* gene. *Molecular and cellular biology*, 27(22), 7947–54. doi:10.1128/MCB.00813-07
- Iwamoto, J., Takeda, T., & Sato, Y. (2006). Effects of vitamin K2 on the development of osteopenia in rats as the models of osteoporosis. *Yonsei medical journal*, 47(2), 157–66. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2687623&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kaneki, M., Hosoi, T., Ouchi, Y., & Orimo, H. (2006). Pleiotropic actions of vitamin K: protector of bone health and beyond? *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 22(7-8), 845–52. doi:10.1016/j.nut.2006.05.003
- Kolios, L., Takur, C., Moghaddam, A., Hitzler, M., Schmidt-Gayk, H., Suda, A. J., Höner, B., et al. (2011). Anamnestic risk factor questionnaire as reliable diagnostic instrument for osteoporosis (reduced bone morphogenic density). *BMC musculoskeletal disorders*, 12(1), 187. doi:10.1186/1471-2474-12-187
- Lee, J., & Vasikaran, S. (2012). Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis. *Annals of laboratory medicine*, 32(2), 105–12. doi:10.3343/alm.2012.32.2.105
- Mccormick, R. K. (2007). Osteoporosis : Integrating Biomarkers and Other Diagnostic Correlates into the Management of Bone Fragility Introduction, 12(2).
- Nishizawa, Y., Ohta, H., Miura, M., Inaba, M., Ichimura, S., Shiraki, M., Takada, J., et al. (2013). Guidelines for the use of bone metabolic markers in the diagnosis and treatment of osteoporosis (2012 edition). *Journal of bone and mineral metabolism*, 31(1), 1–15. doi:10.1007/s00774-012-0392-y
- Peters, B. S. E., & Martini, L. A. (2010). Nutritional aspects of the prevention and treatment of osteoporosis. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 54(2), 179–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20485907>
- Piatek, S., Adolf, D., Wex, T., Halangk, W., Klose, S., Westphal, S., Amthauer, H., et al. (2013). Multiparameter analysis of serum levels of C-telopeptide crosslaps, bone-specific alkaline phosphatase, cathepsin K, osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor κB ligand in the diagnosis of osteoporosis. *Maturitas*, 74(4), 363–8. doi:10.1016/j.maturitas.2013.01.005

- Plaza, S. M., & Lamson, D. W. (2005). Vitamin K2 in bone metabolism and osteoporosis. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*, 10(1), 24–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771560>
- Sachdeva, A., Seth, S., Khosla, A. H., & Sachdeva, S. (2005). Study of some common biochemical bone turnover markers in postmenopausal women. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 20(1), 131–4. doi:10.1007/BF02893058
- Sangkomkamhang, T., Us, S., & Ngamjarus, C. (2010). Vitamin K for the prevention and treatment of osteoporosis in post-menopausal women ( Protocol ), (1).
- Seibel, M. J. (2005). Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, 26(4), 97–122. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1320175&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Shea, M. K., Dallal, G. E., Dawson-hughes, B., Ordovas, J. M., Christopher, J., Donnell, O., Gundberg, C. M., et al. (2009). NIH Public Access, 88(2), 356–363.
- Sogabe, N., Maruyama, R., Baba, O., Hosoi, T., & Goseki-Sone, M. (2011). Effects of long-term vitamin K(1) (phylloquinone) or vitamin K(2) (menaquinone-4) supplementation on body composition and serum parameters in rats. *Bone*, 48(5), 1036–42. doi:10.1016/j.bone.2011.01.020
- Suhara, Y., Wada, A., & Okano, T. (2009). Elucidation of the mechanism producing menaquinone-4 in osteoblastic cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(4), 1054–7. doi:10.1016/j.bmcl.2009.01.021
- Suzuki, A., Sekiguchi, S., Asano, S., & Itoh, M. (2008). Pharmacological Topics of Bone Metabolism: Recent Advances in Pharmacological Management of Osteoporosis. *Journal of Pharmacological Sciences*, 106(4), 530–535. doi:10.1254/jphs.FM0070218
- Szulc, P. (2012). The role of bone turnover markers in monitoring treatment in postmenopausal osteoporosis. *Clinical biochemistry*, 45(12), 907–19. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.01.022
- Tasci, a G., Bilgili, H., Altunay, H., Gecit, M. R., & Keskin, D. (2011). Prospective evaluation of Vitamin K2, Raloxifene and their co-administration in osteoporotic rats. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 43(4), 270–7. doi:10.1016/j.ejps.2011.04.019
- Tavares, V., Canhão, H., António, J., Gomes, M., Simões, E., Romeu, J. C., Coelho, P., et al. (n.d.). R E C O M E N D A Ç Õ E S P A R A O D I A G N Ó S T I C O.
- Terreni, A., & Pezzati, P. (2012). Biochemical markers in the follow-up of the osteoporotic patients. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal*

*Diseases*, 9(2), 80–4. Retrieved from

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3476515&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Vacek, T. P., Kalani, A., Voor, M. J., Tyagi, S. C., & Tyagi, N. (2013). The role of homocysteine in bone remodeling. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, 51(3), 579–90. doi:10.1515/cclm-2012-0605

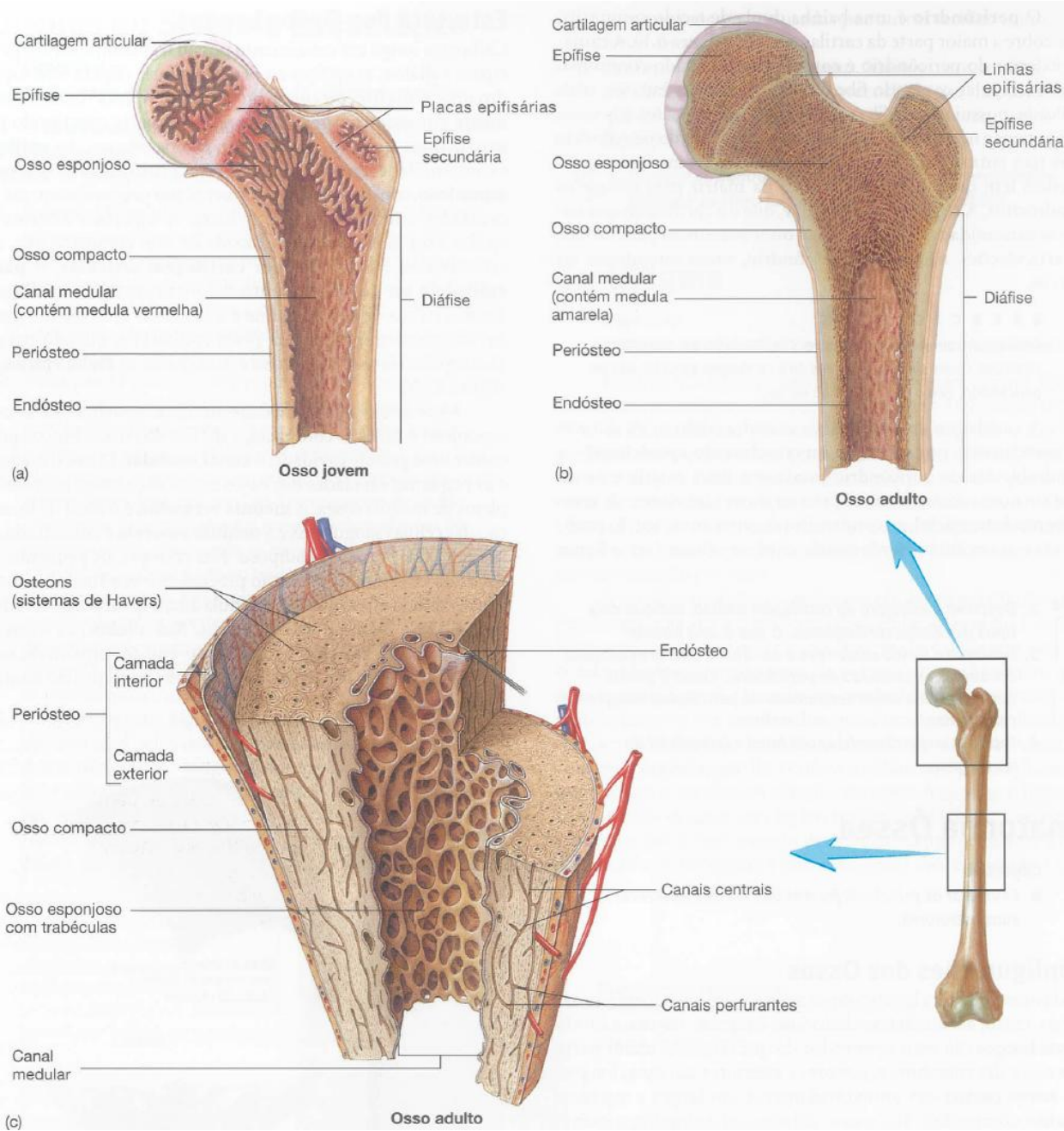
Vermeer, C. (2012). Vitamin K : the effect on health beyond coagulation Á an overview, 1, 1–6. doi:10.3402/fnr.v56i0.5329

Vitamin K Functions and Functional Markers. (n.d.).

Yamauchi, M., Yamaguchi, T., Nawata, K., Takaoka, S., & Sugimoto, T. (2010). Relationships between undercarboxylated osteocalcin and vitamin K intakes, bone turnover, and bone mineral density in healthy women. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 29(6), 761–5. doi:10.1016/j.clnu.2010.02.010

ANEXOS

Anatomia e fisiologia do osso



Anexo 1: Anatomia e fisiologia do osso, (Seeley et al, 2005)

## Fatores de risco associados à Osteoporose

Anexo 2: Fatores de risco associados à Osteoporose. (adaptado de Tavares et al., 2007)

| Fatores de risco associados à Osteoporose        |                                                                             |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Major                                            | Minor                                                                       |
| Idade superior a 65 anos                         | Artrite Reumatóide                                                          |
| Fratura vertebral prévia                         | História de Hipertireoidismo clínico                                        |
| Fratura de fragilidade depois dos 40 anos        | Terapêutica crónica com anti-epiléticos                                     |
| História de fratura da anca num dos progenitores | Baixo aporte de cálcio na alimentação                                       |
| Corticoterapia sistémica com duração > 3 meses   | Tabagismo                                                                   |
| Menopausa precoce (< 40 anos)                    | Consumo excessivo de cafeína (> 2 chávenas por dia)                         |
| Hipogonadismo                                    | Consumo excessivo de bebidas alcoólicas                                     |
| Hiperparatireoidismo primário                    | Índice de massa corporal (IMC) menor do que 19 kg/m <sup>2</sup>            |
| Propensão aumentada para quedas                  | Perda de peso superior a 10% relativamente ao peso do indivíduo aos 25 anos |
|                                                  | Terapêutica crónica com heparina                                            |
|                                                  | Imobilização prolongada                                                     |

## Marcadores de Turnover Ósseo

Anexo 3: Marcadores de Turnover Ósseo (adaptado de Seibel, 2005)

| Marcador                                              | Origem do tecido                      | Espécie | Método Analítico                      | Observações                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Marcadores de Formação Óssea                          |                                       |         |                                       |                                                                                                                                      |
| Fosfatase alcalina específica do osso (BAP, osso ALP) | Ossos                                 | Soro    | Eletroforese, Precipitação, IRMA, EIA | Produto específico de osteoblastos; apresenta reatividade cruzada até 20% com isoenzimas hepáticas                                   |
| Osteocalcina (OC)                                     | Ossos, plaquetas                      | Soro    | RIA, IRMA, ELISA                      | Produto específico de osteoblastos; muitas formas imunorreativas no sangue, alguns podem ser derivados a partir de reabsorção óssea. |
| C-terminal propeptido de colagénio tipo I (PICP)      | Ossos, tecidos moles, pele            | Soro    | RIA, ELISA                            | Produto específico de proliferação de osteoblastos e fibroblastos.                                                                   |
| N-terminal pro-peptídeo de colagénio tipo I (PINP)    |                                       |         | RIA, ELISA                            | Produto específico da proliferação dos osteoblastos e fibroblastos, em parte incorporadas na matriz extracelular óssea.              |
| Marcadores de Reabsorção Óssea                        |                                       |         |                                       |                                                                                                                                      |
| Marcadores de colagénio relacionados hidroxiprolina   | Osso, cartilagem, tecidos moles, pele | Urina   | Colorimetria; HPLC                    | Presente em colagénio fibrillar e proteico e ainda na síntese e maturação de colagénio.                                              |



### Marcadores de Turnover Ósseo

|                                                 |                                             |             |                  |                                                                                                                            |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Glicosídeos de Hidroxilisina                    | Osso, tecidos moles, pele                   | Urina; Soro | HPLC; ELISA      | Hidroxilisina colagénio glicosilada com diferentes tamanhos, consoante o tecido                                            |
| Piridinolina (PYD)                              | Osso, cartilagem, tendões, Vasos sanguíneos | Urina; Soro | HPLC; ELISA      | Presente apenas na maturação do colagénio                                                                                  |
| Deoxipiridinolina (DPD)                         | Osso; dentes                                | Urina; Soro | HPLC; ELISA      | Presente apenas na maturação do colagénio                                                                                  |
| Telopéptidos tipo I (ICTP; CTX-MMP)             | Osso; pele                                  | Urina; Soro | RIA              | Colagénio I e o maior contribuidor para o osso. Derivada da síntese de colagénio                                           |
| Colagénio I crosslinked C-telopeptidos) (CTX-I) | Todos os tecidos                            | Urina; Soro | ELISA; RIA       |                                                                                                                            |
| Colagénio I crosslinked C-telopeptidos) (NTX-I) | Todos os tecidos                            | Urina; Soro | ELISA; CLIA; RIA |                                                                                                                            |
| Proteínas relacionadas com a Matriz Óssea       |                                             |             |                  |                                                                                                                            |
| Sialoproteína (BSP)                             | Osso, cartilagem, dentina                   | Soro        | ELISA; RIA       | Glicoproteína fosforilada acídica sintetizada por osteoblastos e osteoclastos; aparece associado à fração dos osteoclastos |

## Marcadores de Turnover Ósseo

|                                                   |      |                |           |                                                                             |
|---------------------------------------------------|------|----------------|-----------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Fragmentos de osteocacina (ucOC, médios e longos) | Osso | Urina          | ELISA     | Os fragmentos de osteocalcina libertam-se durante a reabsorção óssea        |
| Homocisteína                                      |      | Soro;<br>urina | HPLC-CLIA | Um marcador promissor relacionado com perda de DMO e risco de fratura óssea |